Aus der Medizinischen Klinik A
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. W. Schneider

Eigenschaften Thrombin/Plasmin-behandelter Humanthrombozyten unter besonderer Berücksichtigung des Kalziumstoffwechsels

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Heinz-Günther Braumann

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0095

Aus der Medizinischen Klinik A
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. W. Schneider

Eigenschaften Thrombin/Plasmin-behandelter Humanthrombozyten unter besonderer Berücksichtigung des Kalziumstoffwechsels

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Heinz-Günther Braumann

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan	Referent
der Medizinischen Fakultät	gez.: Prof. Dr. Reimers
der Universität Düsseldorf	Korreferent
gez.: Prof. Dr. Brüster	gez.: Priv.Doz.Dr.v. Voss

INHALTSANGABE

		Seite
1.	Abkürzungen	3
2.	Einleitung und Fragestellung	4
3.	Material und Methoden	11
3.1	Material	11
3.1.1	Aggregationsauslöser	11
3.1.2	Inhibitoren	11
3.1.3	Enzyme	11
3.1.4	Radioaktive Substanzen	12
3.1.5	Substanzen zur Plättchenfixation	12
3.1.6	Andere Substanzen	12
3.1.7	Lösungen	13
3.2	Methoden	15
3.2.1	Präparation gewaschener Thrombozytensuspension	15
3.2.2	Präparation Thrombin-degranulierter Thrombozyten	16
3.2.3	Doppelfixation für die Elektronenmikroskopie	16
3.2.4	Kalziumfällung mit Ammoniumoxalat	17
3.2.5	Kalziumfällung mit Kaliumantimonat	17
3.2.6	Plättchenaggregation	17
3.2.7	^{14}C-Serotoninfreisetzung	18
3.2.8	Messung des Kalziumgehaltes der Thrombozyten	20
3.2.9	Bestimmung der ^{45}Ca-Aufnahme	21
4.	Ergebnisse	23
4.1	Morphologie von nicht-stimulierten und Thrombin-degranulierten Thrombozyten	23
4.2	Aggregation von nicht-stimulierten und Thrombin-degranulierten Thrombozyten	31
4.2.1	durch Thrombin	31
4.2.2	durch Kollagen	31
4.2.3	durch ADP	34

Seite

4.3	Freisetzung von Serotonin aus nicht-stimulierten und Thrombin-degranulierten Thrombozyten	37
4.3.1	Serotoninaufnahme von unstimulierten Thrombozyten	37
4.3.2	Thrombin-induzierte Freisetzung aus unstimulierten Thrombozyten	39
4.3.3	Kollagen-induzierte Freisetzung aus unstimulierten Thrombozyten	39
4.3.4	ADP-induzierte Freisetzung aus unstimulierten Thrombozyten	44
4.3.5	Vergleich der Freisetzungsreaktionen von Thrombin-degranulierten und unstimulierten Thrombozyten	44
4.4	Kalziumgehalt der Thrombozyten vor und nach Aktivierung durch Thrombin	51
4.5	Kalziumaufnahme von Thrombin-degranulierten und unstimulierten Thrombozyten	55
5.	Diskussion	59
5.1	Veränderung des Thrombozyten nach Stimulation durch Thrombin	59
5.1.1	Morphologische Veränderungen	59
5.2	Biochemische Veränderungen	62
5.2.1	Serotoninaufnahme	62
5.2.2	Kalziumgehalt der Thrombozyten	64
5.3	Funktionsstudien	65
5.3.1	Thrombinstimulation	66
5.3.2	Kollagenstimulation	68
5.3.3	ADP-Stimulation	69
5.4	Kalziumtransport durch die Membran	70
5.5	Vergleichende Betrachtung mit Befunden von Kaninchenplättchen	72
6.	Zusammenfassung	76
7.	Literaturverzeichnis	78

1. ABKÜRZUNGEN

ACD	acid citrate dextrose (Zitronensaure Dextrose)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
cpm	counts per minute
5HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
DTS	dense tubular system
HEPES	N-2-Hydroxyäthyl-Peperazin-N-2-Äthansulfonsäure
PGE_1	Prostaglandin E_1
PPO	2,5-diphenyloxazol
POPOP	p-bis 2-(5-phenyloxalolyl) benzene

2. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Thrombin ist bei der Gerinnung unentbehrlich. Es steht einerseits als zentrales Glied in der Kette der Gerinnungsfaktoren und besitzt andererseits die stärkste Wirkung aller physiologischer Substanzen, die die Thrombozyten aktivieren und den Sekretionsprozeß (Freisetzungsreaktion) einleiten können (34, 38, 43, 65, 74, 149). Um eine vollständige Plättchenreaktion auszulösen, benötigt es ionisiertes Kalzium (34, 91, 129). Es ist eine Trypsin-ähnliche Protease mit hoher Spezifität (109). Da Thrombin - wie die meisten Substanzen, die Plättchen aktivieren - nicht in die Zelle eindringt, wird vermutet, daß es seine Wirkung über spezifische Rezeptormoleküle in der Plasmamembran ausübt. Über die dort ablaufenden Veränderungen gibt es mehrere Theorien:

Zum einen wird die initiale Interaktion zwischen Thrombin und der Membran als Proteolyse angesehen (23, 34, 105). Dies findet Unterstützung in dem Befund, daß Thrombin keine Reaktion auslöst, wenn seine proteolytische Aktivität zerstört ist (22). Berichte über Versuche mit Thrombin, dessen esterolytisches und proteolytisches Zentrum gehemmt war, haben jedoch ergeben, daß es auch dann noch durch Membranbindung die Aggregations- und Freisetzungsbereitschaft durch nicht modifiziertes Thrombin zu potenzieren vermag (109). Von anderen Autoren wird die einfache Thrombineinwirkung ohne Proteolyse - analog einer Thrombin-Rezeptor-Reaktion - als ausreichend angesehen, um eine Plättchenreaktion auszulösen (70).

Ähnlich umstritten wie der Mechanismus der Thrombinwirkung ist zur Zeit auch noch der eigentliche Angriffspunkt an der Plasmamembran:

Als ein mögliches Rezeptormolekül wurde Fibrinogen ge-

nannt (83). Bei gewaschenen Thrombozyten befindet es sich in den α-Granula (83,95) und wird erst während der Freisetzungsreaktion sezerniert (21, 34). Daher ist es unwahrscheinlich, daß plasmagebundenes Fibrinogen den primären Thrombinrezeptor darstellt. Es gibt aber Hinweise, daß Thrombin zumindest einen Teil des aus den α-Granula freigesetzten Fibrinogens in Fibrin umwandelt.

Weiter wurde ein hochmolekulares, Thrombin-sensibles Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 11800 Dalton auf der Membranoberfläche gefunden. Es entspricht dem sogenannten Thrombospondin, einem endogenen Lecthin, das ebenfalls Bestandteil der α-Granula ist. Wie sich herausgestellt hat, erscheint es erst nach der Thrombin-induzierten Plättchenaktivierung an der Außenseite der Membran und unterstützt wahrscheinlich die Plättchen-Plättchen Interaktion.

Schließlich wurden Faktor XIII und Thrombosthenin als Rezeptormoleküle in Erwägung gezogen (11, 31, 58, 63, 65). Sie erwiesen sich aber als zytoplasmatische Bestandteile. Ebensowenig ließ sich das S-Thrombosthenin, ein Aktomyosin-ähnliches Protein auf der Zellmembran, als Rezeptormolekül verifizieren.

In neueren Untersuchungen ist es gelungen, ein proteolytisches Substrat für Thrombin an der Zelloberfläche zu isolieren - das Glykoprotein V mit einem Molekulargewicht von 92000 Dalton (85, 111). Nach Thrombinwirkung ist es aus der Membran verschwunden. Dafür erscheint im Überstand ein hydrolysiertes Fragment mit einem Molekulargewicht von 70000 Dalton.

Ein zweiter Angriffspunkt für Thrombin scheint das Glykoprotein I zu sein (108). An dieses Molekül wird wahrscheinlich neben aktivem auch inaktiviertes Throm-

bin gebunden.

Neben den Rezeptormolekülen integriert die Plasmamembran des Plättchens noch verschiedene andere Substanzen und Eigenschaften, zum Beispiel Enzyme wie Phosphatasen und Glykosyltransferasen (52), Gerinnungs- und Plasmafaktoren (49) und Fibrinogen (66). Lokalisiert sind diese Substanzen bzw. Membraneigenschaften in der sogenannten Glykokalix, die die glatte Oberfläche des Plasmalemm umgibt (3, 143).

Durch die Wechselwirkung von Agonist und Thrombozyt kommt es in der Zelle zu einer Reihe typischer Reaktionsabläufe mit morphologischen Veränderungen, der Freisetzungsreaktion (13) sowie Aktivierung des Stoffwechsels (54, 60, 67, 86, 151). Bis heute sind viele Substanzen gefunden worden, die in vivo und in vitro die Plättchen stimulieren können und damit zur Aggregation und Freisetzungsreaktion führen (10, 41, 71, 89). Diese Substanzen führen wahrscheinlich zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration. Dadurch werden die ATP-verbrauchenden kontraktilen Prozesse in Gang gesetzt, die zur Freisetzungsreaktion führen (49). Die Uniformität der Antwort läßt vermuten, daß jeder Reiz zur gleichen Membranveränderung führt, oder den gleichen "second messenger" aktiviert (67).

Da Formänderung und Freisetzungsreaktion auch ohne extrazelluläres Kalzium stattfinden, wird vermutet, daß ein intrazellulärer Speicher als Quelle mobilisiert werden kann (28, 29, 75, 147). Vorausgesetzt die Reizung erreicht nicht den Schwellenwert, sind Formänderung und Aggregation reversibel, und die Plättchen können ihre diskoide Form zurückerlangen und normal weiter zirkulieren. Dies gilt auch für Plättchen, die die Freisetzungsreaktion vollzogen haben.

Im ruhenden Plättchen ist die Konzentration der Kalziumionen wahrscheinlich genauso niedrig wie in der Muskelzelle - ungefähr 10^{-7} Mol/l (12). Sehr früh im Verlauf der Aktivierung nimmt die Konzentration zu (25, 62). Bewiesen wird die Zunahme der Kalziumkonzentration im Zytoplasma auch durch den raschen Zusammenbruch des mikrotubulären Systems. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für den Formwandel. Darüber hinaus sind die kontraktilen Prozesse, die die Grundlage der meisten morphologischen Veränderungen der aktivierten Plättchen darstellen, abhängig von der Verfügbarkeit von Kalziumionen (8, 9, 12, 75).

MASSINI et al. fanden, daß die Permeabilitätserhöhung für Kalzium, die zu der Konzentrationserhöhung führt, noch für Stunden nach Stimulation anhält (77). Auf der anderen Seite wurde gefunden, daß die Plättchen ihren normalen Ruhezustand wiedererlangen können. Dies setzt aber eine Herabsetzung der Kalziumkonzentration im Zytoplasma voraus, was bei einer erhöhten Membranpermeabilität kaum möglich wäre (122).

FRAGESTELLUNG

Verschiede Beobachtungen haben ergeben, daß Thrombin im Plasma eine reversible Plättchenaggregation bewirkt, falls es nicht zur zweiten Phase der Aggragation mit Freisetzungsreaktion kommt (17, 44, 80, 90, 136). Werden Plättchen in apyrasehaltiger Tyrodelösung stimuliert, kommt es auch nach der Freisetzung von Granulainhaltstoffen unter bestimmten Bedingungen zur reversiblen Aggregation. Voraussetzung ist neben der Anwesenheit von Apyrase, einem Enzym, daß sezerniertes ADP abbaut, die Zugabe von Plasmin, wodurch die Fibrinbildung verhindert wird. Die Desaggregation wird durch Prostaglandin E_1 induziert (120).

Auf erneuten Thrombinkontakt zeigen diese Plättchen keine Reaktion (39, 56, 83, 120, 122). Die Reaktion auf Kollagen ist abgeschwächt, die Empfindlichkeit gegenüber ADP dagegen erhöht (102, 120, 123). Die Menge an freigesetzten Substanzen ist in beiden Fällen im Vergleich zu unstimulierten Plättchen deutlich herabgesetzt.

Durch Stimulation mit Thrombin verlieren die Plättchen den größten Teil an Serotonin, Kalzium und Adeninnukleotiden (47, 51, 54, 120).

Eine analoge Verminderung von Granulainhaltsstoffen konnte bei Plättchen gefunden werden, die der sogenannten Schwartzmann-Reaktion unterworfen waren (141), bei Patienten mit disseminierter intravaskulärer Gerinnung (105), bei Anwesenheit von Thrombozytenantikörpern (150) sowie nach Operationen am offenen Herzen mit extrakorporalem Kreislauf (40). Es muß angenommen werden, daß die Plättchen auch unter diesen Bedingungen im Rahmen von Gerinnungs- und Fibrinolyseabläufen mit Thrombin und Plasmin in Kontakt gekommen sind, und daß hierdurch offensichtlich die Freisetzungsreaktionen induziert worden sind.

Während es beim Kaninchenplättchen als erwiesen gilt, daß die Thrombin-induzierte Aggregation und Freisetzung reversibel sind (124), haben Versuche in vitro mit Humanthrombozyten noch keinen endgültigen Beweis erbracht, in welchem Umfang die Veränderungen der Aktivierung die Funktions- und Rezirkulationsfähigkeit der Zellen beeinflußt. Daß diese Veränderungen zumindest teilweise reversibel sein müssen, legen die oben angeführten Beispiele nahe.

Unklarheiten bestehen aber unter anderem über das Ver-

halten der Kalziumionen während und nach der Stimulation, die bei sämtlichen Plättchenreaktionen eine bedeutende Rolle spielen. Obwohl es als erwiesen gilt, daß das Zytoskelett der Zellen nur bei niedrigen Kalziumionenkonzentrationen im Ruhezustand bestehen kann und dieses System von Mikrotubuli auch bei Thrombozyten nach Stimulierung wieder gefunden werden konnte, haben andere Befunde ergeben, daß die Plasmamembran nach Aktivierung für dieses Kation permeabel bleibt (77). Dies würde aber die Fähigkeit zur Rekonstruktion der Zellintegrität schwer erklärbar machen.

Die vorgelegten Experimente sollen einen Beitrag leisten, Eigenschaften und Verhalten von Thrombin- und Plasmin-exponierten Humanthrombozyten weiter zu charakterisieren.

Da die Methode der Thrombozytenpräparation die Ergebnisse stark beeinflussen kann, wurden die hier beschriebenen Versuche in einem zwar synthetischen, jedoch in bezug auf die Ionenkonzentrationen weitgehend physiologischen Medium nach den Angaben von MUSTARD et al. durchgeführt (92).

Zur Beurteilung von methodisch bedingten Plättchenalterationen wurden morphologische, funktionelle und biochemische Studien an den Anfang gestellt, in denen die Eigenschaften von Thrombin-degranulierten Thrombozyten mit denen nicht stimulierter Kontrollplättchen verglichen wurden.

Daraufhin sollten im einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche morphologischen Veränderungen finden sich in Thrombin und Plasmin behandelten Humanthrombozyten?
2. Wie ist das Funktionsverhalten von Thrombin und

Plasmin behandelten Humanthrombozyten?

3. Läßt sich in Humanthrombozyten, die nach Thrombin- und Plasminvorbehandlung in morphologischer und funktioneller Hinsicht weitgehend intakt erscheinen, eine Erhöhung der Permeabilität der Plasmamembran für Kalziumionen nachweisen?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Aggregationsauslöser

Thrombinum purum (Behring Werke, Marburg/Lahn):
100 NIH-Einheiten ≙ 0,33 g gelöst in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung ergibt 50 U/ml.
Kollagen-Horm^{R} (Hormon Chemie, München GmbH):
0,4 ml Kollagenreagenz Horm gelöst in 1,6 ml SKF-Horm^{R} Puffer ergibt 2 ml Lösung mit 200 µg Kollagenfibrillen per 1000 ml.
ADP (C.F. Boehringer Mannheim GmbH):
0,01281 g gelöst in 30 ml phiologischer Kochsalzlösung ergibt eine Konzentration von 10^{-3} Mol/l.

3.1.2 Inhibitoren

Heparin (Liquemin^{R}) wurde von der Firma Roche bezogen.
Prostaglandin E_1 (Upjohn Co., Kalamazoo, Michigan) wurde in 95%igem Äthanol gelöst. Zu einem Milliliter dieser Lösung wurden 9 ml Natriumkarbonat-Kochsalzgemisch (2 mg Na_2CO_3 + 10 ml NaCl 0,9%ig) gegeben, so daß eine PGE_1-Stammlösung mit einer Konzentration von $2{,}9 \cdot 10^{-3}$ Mol/l entstand.

3.1.3 Enzyme

Humanplasmin (Kabi GmbH, München):
25 Einheiten (entspr. Inhalt einer Ampulle) in 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst ergibt eine Endkonzentration von 10 E/ml.
Apyrase from Potato (Fa. Sigma Chemical, Co.):
2000 U gelöst in 40 ml physiologischer Kochsalzlösung

50 U/ml - bezogen auf 5-ATPase-Aktivität.

3.1.4 Radioaktive Substanzen

5 Hydroxy-(Seitenketten-2-^{14}C) tryptaminkreatinsulfat (^{14}C-Serotonin) mit einer spezifischen Aktivität je nach Charge zwischen 50-60 mCi/mmol und ^{45}Kalzium als $^{45}CaCl_2$ in wäßriger Lösung (spezifische Aktivität zwischen 10-40 mCi/mg Ca) wurden von der Firma Radiochemikalien Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig bezogen.

3.1.5 Substanzen zur Plättchenfixation

Glutaraldehyd purissimum 25% wurde von der Firma Carl Roth KG, Chemische Fabrik Karlsruhe bezogen, Cacodylsäure-Natriumsalz (Dimethylarsinsäure-Natriumsalz) von der Firma Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm. Zur Herstellung des Na-Cacodylatpuffers wurden 10,7 g Na-Cacodylsäure in 500 ml Aqua bidest. gegeben und mit 32%iger (konz.) Salzsäure (Fa. Merck) auf pH 7,2 eingestellt. Ammoniumoxalat Monohydrat puriss., Araldit M und Kaliumantimon (III) oxidtartrat purum wurden ebenfalls von der Firma Fluka Feinchemie gekauft. Azeton, 7,5% Saccharose, Tannin gepulvert rein DAB 7 (Gallotannin) lieferte die Firma Merck, Alcianblau 1% die Firma Serva Feinbiochemica Heidelberg.

3.1.6 Andere Substanzen

Humanfibrinogen (Kabi GmbH, München):
1 g Trockensubstanz wurden in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Pentex^{R}-Rinderalbumin wurde von den Behring-Werken, Marburg/Lahn bezogen, Hepes-Puffer (N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-äthansulfonsäure) von der Firma Serva Feinbiochemica Heidelberg, ebenso

die speziell gereinigte Triton-X-100-Szintilationsflüssigkeit. PPO (2,5-diphenyloxazol) und POPOP (p-bis (2-(5-phenyloxazolyl))benzene) lieferte die Firma Merck. Nach Angaben von Pasternak und Snyder (107) wurde die Szintilationsflüssigkeit für die Messung der ^{45}Kalziumaufnahme hergestellt (250 ml Triton-X-100, 7,3 g PPO und 167 mg POPOP). Aqua-sol wurde von NEN bezogen.

3.1.7 Lösungen

ACD-Lösung:
25 g Tri-Natriumcitrat
14 g Zitronensäure
20 g Dextrose (D+ Glucose Monohydrat)
ad 1000 ml aqua dest.
pH 4,5
Tyrode-Albumin-Lösung:
Stammlösung I
160 g NaCl
4 g KCl
20 g $NaHCO_3$
1 g NaH_2PO_4
ad 1000 ml aqua dest.
Stammlösung II
22,33 g MgCl
ad 1000 ml aqua dest.
Stammlösung III
21,91 g CaCl
ad 1000 ml aqua dest.
50 ml Stammlösung I
750 ml aqua dest.
10 ml Stammlösung II
20 ml Stammlösung III
3,5 g Pentex^R-Rinderalbumin
1 g Dextrose

1,19 g Hepes-Puffer (Endkonz. 5 mMol/l)
ad 1000 ml aqua dest.
pH 7,35
Stammlösung für die Eichgerade der atomabsorbtions-photometrischen Kalziummessung:
1,249 g Kalziumkarbonat
ad 50 ml aqua bidest.
zur vollständigen Lösung möglichst wenig konz. HCl (6-10 ml) tropfenweise zugeben
ad 1000 ml aqua bidest.
Endkonzentrat 500 ug Kalzium/ml
Lösungen zur Kalziumfällung für die Elektronenmikroskopie:
Fixierlösung I
0,25 g Kalziumantimonat
0,1 g Osmiumtetroxyd
ad 10 ml aqua dest.
Fixierlösung II
2,5 ml Glutaraldehyd 25%
10 ml Veronal-Acetat-Stammlösung
10 ml HCl 0,1 n
27,5 ml Aqua bidest.
2,25 g Saccharose
17,8 mg Ammoniumoxalat
Fixierlösung III
10 ml Veronal-Acetat-Stammlösung
10 ml HCl 0,1 n
30 ml Aqua bidest.
2,25 g Saccharose
35,6 mg Ammoniumoxalat
Fixierlösung IV
50 : 50 Aceton - Aqua bidest.

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung gewaschener Thrombozytensuspension

500 ml einer tagesfrischen ACD-Vollblutkonserve wurden mit ACD-Lösung auf pH 6,35 (PHM 64 Research pH Meter, Radiometer Copenhagen) eingestellt, 10 min mit 650 · g (entspr. 2000 U/min) zentrifugiert (Labofuge III, Fa. Heraeus Christ) und das überstehende Plasma mit einer Pasteurpipette aus Glas vorsichtig in spitze Zentrifugenröhrchen (Polystyrol Spitzröhre, Fa. Sarstedt) abpipettiert.

Danach wurde das plättchenreiche Plasma 25 min mit 1500 x g (entspr. 3000 U/min) zentrifugiert, das überstehende plättchenarme Plasma verworfen, das Thrombozytensediment in 20 ml auf 37°C temperierter Tyrode-Albumin-Lösung mit Zusatz von 100 µl Heparin und 100 µl Apyrase pro 10 ml aufgeschwemmt und 10 min im Wasserbad (Kottermann Wasserbad) bei 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgte eine zweite Zentrifugation mit 1200 x g (entspr. 2800 U/min) für 15 min, erneutes Dekantieren des Überstandes, Aufschwemmen des Plättchenpfropfes in erwärmter frischer Tyrode-Albumin-Lösung mit 100 µl Apyrase pro 10 ml Suspension und Inkubation im Wasserbad.

Hier schloß sich ein letzter Waschvorgang an und die so erhaltene Plättchensuspension wurde je nach Experiment durch Verdünnung mit Tyrode-Albumin-Lösung auf eine vorgewählte Endkonzentration eingestellt. Die Bestimmung der Plättchenzahl/ µl erfolgte mit einem Thrombocounter/C (Fa. Coulter Electronics GmbH).

3.2.2 Präparation Thrombin-degranulierter Thrombozyten

Nach oben beschriebener Präparation der Thrombozyten wurde eine Endkonzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ µl gewählt.

Nach Aktivierung der Plättchen durch Thrombinzugabe (Endkonz. 1 U/ml Suspension) wurde Prostaglandin E_1 (Endkonz. 10^{-6} Mol/l) und Plasmin (Endkonz. 0,075 E/ml) in die Suspension gegeben, nachdem die Aggregationsbildung sichtbar geworden war. Die spontane Desaggregation der Thrombozyten erfolgte bei 37°C innerhalb von 30-60 min, worauf die Suspension ein weiteres Mal gewaschen und entsprechend der unten beschriebenen Experimente weiterbehandelt wurde.

In die Suspension der Kontrollplättchen gaben wir statt Thrombin und Plasmin entsprechende Volumina physiologischer Kochsalzlösung, statt Prostaglandin E_1 äthanolhaltige Natriumkarbonat-Kochsalzlösung.

3.2.3 Doppelfixation für die Elektronenmikroskopie

Zu 10 ml Thrombozytensuspension wurden 0,1 ml 25% Glutaraldehyd und 0,4 ml 0,1n Na-Cacodylatpuffer (pH 7,2) gegeben, 10 min inkubiert und 15 min mit 1200 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und die Plättchen mit Fixierlösung, die 20 Vol% Glutaraldehyd, 80 Vol% Na-Cacodylatpuffer und 7,5 g% Saccharose enthielt, überschichtet. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte Zerkleinerung der Plättchenschicht in Blöckchen mit etwa 1mm Kantenlänge, Nachfixieren mit oben beschriebener Fixierlösung und Waschen mit Cacodylatpuffer mit Saccharosezusatz.

Bei einem Teil der Proben wurde der Fixationslösung
a) 1% Alcianblau (Glykokalixkontrast)

b) 0,5 - 1% Tannin (Stabilisierung der Proteinstruktur) zugesetzt. Hieran schloß sich die Dehydrierung in steigender Azetonkonzentration und Einbettung in Epoxydharzen.

3.2.4 Kalziumfällung mit Ammoniumoxalat

Die Plättchensuspension wurde in eine Ammoniumoxalathaltige Fixierlösung (siehe 3.1.7, Fixierlösung II) gegeben, 30 min inkubiert, 15 min mit 1200 x g zentrifugiert, anschließend in eine weitere Fixierlösung gegeben (siehe 3.1.7, Fixierlösung III), dehydriert und eingebettet.

3.2.5 Kalziumfällung mit Kaliumantimonat

Die Plättchensuspension wurde in eine Kaliumantimonathaltige Fixierlösung (siehe 3.1.7, Fixierlösung I) gegeben, inkubiert, mit 1200 x g zentrifugiert, anschließend in Fixierlösung IV (siehe 3.1.7) überführt und in üblicher Weise weiterbehandelt.

3.2.6 Plättchenaggregation

Für die Aggretationsexperimente betrug die Thrombozytenzahl 5 x 10^5/ µl. Je 1 ml Suspension wurde in eine Plastikküvette des Aggregometers mit Magnetrührer (Braun Universalaggregometer in Verbindung mit Eppendorf Photometer 1101 M) gegeben und die Lichttransmission registriert (Eppendorf Kompensationsschreiber 6512).

Die aggregationsauslösenden Substanzen Thrombin (Endkonz. 1U/ml) und ADP (Endkonz. 10^{-5} Mol/l, 10^{-6} Mol/l) wurden mit einer 100 µl Eppendorfpipette zugefügt, Kollagen mit 5 bzw. 20 µl Pipetten (Endkonz. 1 µg bzw. 4 µg Kollagenlösung). Vor Zugabe von ADP wurden 100 µl Fibrinogen in die Küvette pipettiert, vor Zu-

gabe von Thrombin und Kollagen 100 µl Tyrode-Albumin-Lösung.

3.2.7 ^{14}C-Serotoninfreisetzung

In die zweite Waschsuspension wurden 0,2 ml ^{14}C-Serotonin/10 ml Suspension (spez. Aktivität 0,2 µCi/ml) gegeben und danach die Plättchen 20 min bei 37°C inkubiert, um ihnen Zeit zur Speicherung des Amins zu geben. Die letzte Suspension wurde durch Verdünnung mit Tyrode-Albumin-Lösung auf eine endgültige Plättchenkonzentration von 5 x 10^5/ µl eingestellt.

Proben von jeweils 1 ml Suspension pipettierten wir in Plastikküvetten und induzierten im Aggregometer die Freisetzungsreaktion mit Thrombin (Endkonz. 0,5-5 U/ml), Kollagen (Endkonz. 1 µg, 4 µg, 10 µg/ml) bzw. ADP (Endkonz. 10^{-5} Mol/l, 10^{-6} Mol/l). Genau drei Minuten nach Zugabe der Stimulationssubstanz wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml kalter Tyrode-Albumin-Lösung unter Zusatz von 4% Formaldehyd beendet, die Suspension in ein Polystyrolzentrifugenröhrchen gegeben, sofort zentrifugiert und 0,1 ml des Überstandes mit 10 ml Aqua sol verdünnt und die Radioaktivität mit einem Szintillationsspektrometer (Packard Liquid Szintillationsspectrometer Tri-Carb Model 3380) bestimmt.

Die Gesamtradioaktivität der Suspention und die Radioaktivitätsmenge in der Suspensionsflüssigkeit, d.h. im zellfreien Überstand nach Abzentrifugieren der Plättchen, wurden gemessen. Aus der Differenz beider Werte errechnete sich die markierte Serotoninmenge, die von den Plättchen während der Inkubationszeit aufgenommen wurde.

Um das Ausmaß des unspezifischen Serotoninverlustes

der Plättchen im Aggregometer zu berücksichtigen, wurde bei jedem Versuch ein Leerwert bestimmt. Zu diesem Zweck wurde an Stelle einer aggregationsauslösenden Substanz 100 µl Tyrode-Albumin-Lösung zu der Suspension gegeben und die Probe entsprechend weiterbehandelt.

Bei den vergleichenden Experimenten der Serotoninfreisetzung aus Thrombin-degranulierten Plättchen wurde die aus einer Vollblutkonserve gewonnene Thrombozytenmenge in zwei Hälften geteilt. Die eine Portion wurde wie beschrieben durch Zugabe von Thrombin (Endkonz. 1 U/ml) stimuliert (Probe A), die andere diente als Kontrolle (Probe B). Zunächst wurde aus der Gesamtradioaktivität und der Radioaktivität im zellfreien Überstand die prozentuale Serotoninaufnahme errechnet, drei Minuten nach Thrombinstimulierung erneut die Aktivitätsmenge in der Suspensionsflüssigkeit gemessen und hieraus der Anteil des freigesetzten ^{14}C-Serotonins bestimmt. Sobald die Thrombozyten vollständig desaggregiert waren - nach 30-60 min - wurde aus der Gesamtradioaktivität und der Radioaktivität im zellfreien Überstand die wieder aufgenommene ^{14}C-Serotoninmenge berechnet.

Nach dem letzten Waschgang wurden die Suspensionen (degranulierte Probe A und unstimulierte Kontrollplättchen B) mit Tyrode-Albumin-Lösung soweit verdünnt, daß die Plättchenkonzentration 1 x 10^6/ µl betrug. Darauf wurde die Radioaktivitätsmenge in den Thrombozyten wie oben beschrieben errechnet, sowie ein Leerwert als Maß für die unspezifischen Verluste im Aggregometer und schließlich die freigesetzte Serotoninmenge als prozentualer Anteil des gesamten ^{14}C-5 HT in den Zellen nach Stimulation mit Thrombin, Kollagen und ADP.

3.2.8 Messung des Kalziumgehaltes der Thrombozyten

Die Thrombin-degranulierten Thrombozyten und die unstimulierten Kontrollplättchen wurden in Kalzium-freier Tyrode-Albumin-Lösung aufgeschwemmt. Die Suspensionen wurden verdünnt, so daß die Endkonzentration der Plättchen 10°/ µl betrug. Danach wurden die Suspensionen durch Ultraschall (Braun Sonic 300 Sonifier) homogenisiert.

Der Kalziumgehalt wurde mit einem Atomabsorbtionsphotometer (AAS Perkin Elmer 300) mit einem Lachgas-Acetylen-Gasgemisch von 2:1 an Hand einer unmittelbar vorher erstellten Eichkurve (Abb. 1) bestimmt.

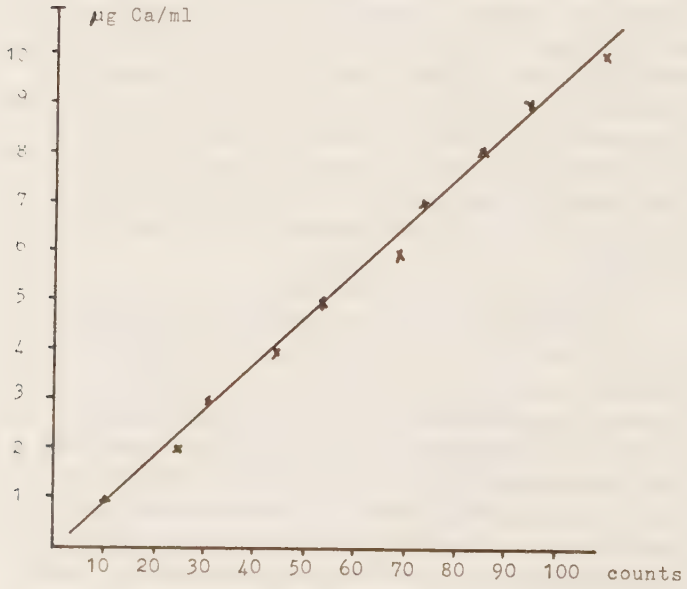

Abb. 1: Eichkurve der Kalziummessung

3.2.9 Bestimmung der ^{45}Ca-Aufnahme

Die Thrombin-degranulierten Thrombozyten und die unstimulierten Kontrollplättchen wurden in Kalzium-freier Tyrode-Albumin-Lösung aufgeschwemmt und durch Verdünnung auf eine Endkonzentration von 5×10^5 Zellen/µl eingestellt.

Je 1 ml Suspension wurde nach Zugabe von 10 µl ^{45}Ca (spez. Aktivität 1 nCi/2 pmol) bei 37°C für 30 sec, 1 min, 2 min, 4 min bzw. 6 min inkubiert. Hundert Mikroliter Suspension wurden danach in 10 ml einer gekühlten Ca-freien Tyrode-Albumin-Lösung unter Zusatz von 4% Formaldehyd gegeben und sofort durch einen Millipore-Filter filtriert (Typ HA, Porengröße 0,45 µm). Es war nicht möglich, eine höhere Plättchenzahl zu filtrieren, da die Filter sonst verstopften. Die Filterplättchen wurden getrocknet und in jeweils 10 ml Triton X-100 Szintillationsflüssigkeit nach PASTERNAK und SNYDER (107) gemessen. Die bestimmte Radioaktivität entspricht der ^{45}Kalzium-Aufnahme von 5×10^7 Plättchen bei 37°C. Jede Messung wurde als Triplikat durchgeführt und jeweils der Mittelwert bestimmt.

Bei allen Meßwerten wurde der sog. "back-ground" abgezogen, d.h. die Anzahl der counts bei Messung von 10 ml Triton X-100 Szintillationsflüssigkeit.

Um die ^{45}Kalziummenge zu berücksichtigen, die beim Filtrieren am Filterplättchen haften bleibt, wurde ein Leerwert bestimmt, wobei an Stelle der Plättchensuspension 1 ml Kalzium-freie Tyrode-Albumin-Lösung nach Zugabe von 10 µl ^{45}Kalzium (spez. Aktivität 1 nCi/2 pmol) genommen wurde.

Die ^{45}Kalziummenge, die an der Plättchenmembran absorbiert wird ohne aktive Aufnahme durch die Thrombozy-

ten, wurde in Form eines Nullwertes ermittelt. Zu 1 ml Suspension wurden 10 µl Formaldehyd (4%) gegeben, um die Zellen zu fixieren und eine Kalziumaufnahme durch die Membran zu verhindern. Die Probe wurde gekühlt und nach Zugabe von 10 µl ^{45}Kalzium sofort filtriert.

Zur Berechnung der insgesamt aus der Suspensionsflüssigkeit aufgenommenen Kalziummenge, d.h. der Summe aus markiertem und "kaltem" Kalzium, wurden je 10 ml der Thrombin-degranulierten- und der Kontrollplättchen-Suspension zentrifugiert und der Gesamtgehalt im plättchenfreien Überstand durch die Atomabsorbtionsphotometrie bestimmt. Das Verhältnis von zugefügtem radioaktivem und dem nicht markierten Kalzium entspricht der tatsächlichen spezifischen Aktivität des Kations im Suspensionsmedium der Thrombin-degranulierten bzw. der Kontroll-Thrombozyten.

4. ERGEBNISSE

4.1 Morphologie von nicht-stimulierten und Thrombin-degranulierten Thrombozyten

Die unstimulierten gewaschenen Plättchen besitzen eine diskoide Form (Abb. 1). Ihre Oberfläche ist glatt. An vereinzelten Thrombozyten sind kurze, plump wirkende Pseudopodien zu erkennen. Begrenzt werden die Zellen von einer dreischichtigen Plasmamembran, der außen eine unscharf begrenzte, elektronendichte Schicht anhaftet - die Glykokalix.

Im Hyaloplasma befinden sich neben Mikrotubuli Mikrofilamente, membranbegrenzte Organellen und Glykogen. Die deutliche Trennung des Hyaloplasma ungewaschener Thrombozyten in organellenfreie Außenzone und Granulomer, dem Plättchenzentrum, das die Organellen beherbergt, scheint bei den gewaschenen Thrombozyten nicht aufgehoben zu sein. Nur vereinzelt sieht man Organellen nahe der Plasmamembran, außerhalb des marginalen Bündels.

Im Querschnitt erkennt man zirkulär verlaufende Mikrotubuli in der Außenzone. In enger räumlicher Verbindung zu den Mikrotubuli stehen elektronendichte Strukturen, das "dense tubular system". An membranbegrenzten Organellen sieht man Mitochondrien, die elektronendichten "dense bodies" und α-Granula.

Auffällig ist die Armut an Glykogengranula in den gewaschenen Plättchen im Vergleich zu Thrombozyten aus plättchenreichem Plasma.

Die Thrombin-degranulierten Plättchen haben ebenfalls wieder eine diskoide Form angenommen (Abb. 2a und 2b).

Abb. 1: unstimulierte, gewaschene Thrombozyten. An der Außenfläche erkennt man die Glykokalix (breite Pfeile). An Organellen sieht man wenige Vakuolen (V), Granula und Mitochondrien (M). An den Zellpolen liegen das "dense tubular system" (DTS) sowie Mikrotubuli (MT). (Maßstab = 1 µm)

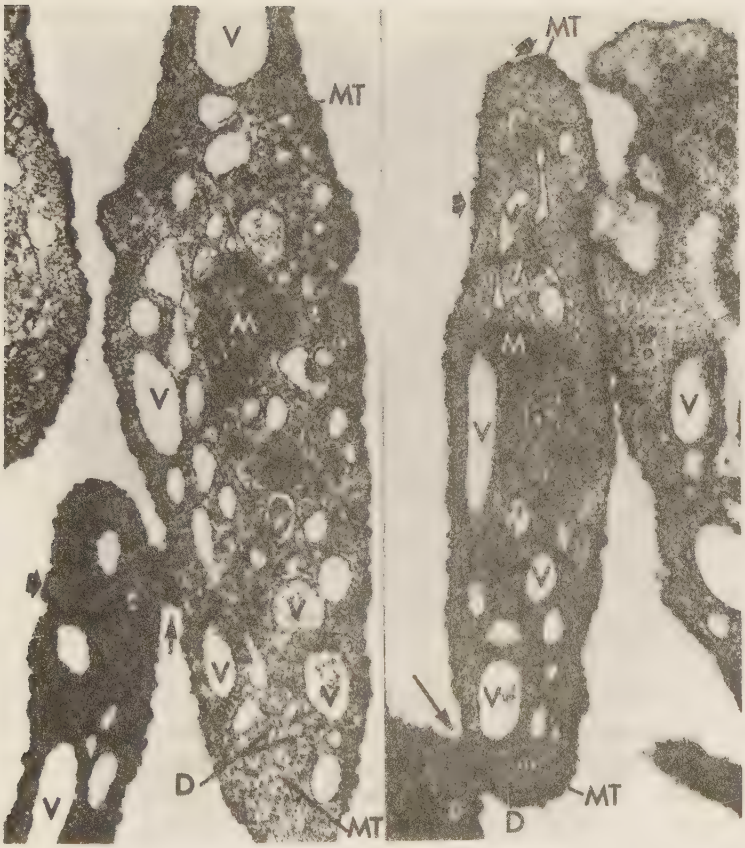

Abb. 2: Thrombin-degranulierte Thrombozyten.
Im Hyaloplasma sind Mikrotubuli (MT), das "dense tubular system" (DTS) und Mitochondrien (M) zu erkennen. Auffällig ist der Reichtum an Vakuolen (V). An der Außenfläche ist die Glykokalix sichtbar (breite Pfeile), die nach Thrombinstimulation in regelmäßigen Abständen unterbrochen zu sein scheint.
(Maßstab = 1 µm)

Sie besitzen eine glatte Oberfläche. In der Außenzone des Hyaloplasma erkennt man das Bündel zirkulär verlaufender Mikrotubuli. Das "dense tubular system" ist ebenfalls vorhanden. Ansonsten sind im Zytoplasma nur Mitochondrien und relativ große Vesikel zu erkennen. "Dense bodies" und α-Granula sind nicht zu finden.

Die Kalziumfällung durch Kalium-Antimonat zeigt deutliche elektronendichte Präzipitate in den "dense bodies" der umstimulierten Plättchen. Die schlechte Erhaltung der Endomembransysteme nach dieser Methode macht es leider unmöglich, zwischen DTS und Vesikelsystem zu unterscheiden. Präzipitate in diesen Strukturen (Abb. 3) können deshalb nicht bewertet werden.

Die Anwendung von Ammoniumoxalat führte zu wenig elektronendichten Präzipitaten in Membrannähe, die im DTS deutlicher hervortraten (Abb. 4a) und auch in degranulierten Plättchen sichtbar waren (Abb. 4b).

Mit Tannin fixierte gewaschene Plättchen sind an der Oberfläche mit einer bis zu 50 nm dicken Schicht feiner Filamente bedeckt (Abb. 5). Nach Thrombinstimulation ist dieser Coat nicht wesentlich verändert.

Alcianblau im Fixans bewirkt die Darstellung einer gleichmäßig dicken (bis 70 nm) Gylkokalix, die dem Plasmalemm nicht direkt aufsitzt. Vielmehr ist ein deutlich sichtbarer Spalt von etwa 10 nm zwischen Plasmalemm und elektronendichter Glykokalix vorhanden (Abb. 1). Nach Thrombinstimulation ist die Glykokalix in ziemlich regelmäßigen Abständen unterbrochen (Abb. 2a und 2b). Ein heller Spalt zwischen Plasmalemm und Glykokalix ist weiterhin vorhanden (Abb. 2). Zählungen ergaben, daß etwa 550 Glykokalixreste / μm^2 Plättchenoberfläche vorhanden sind.

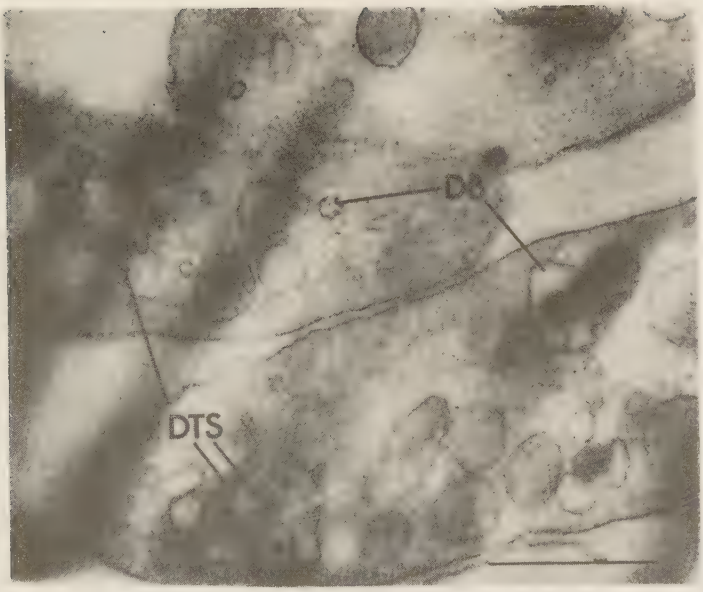

Abb. 3: Kalziumfällung durch Kalium-Antomonat.
In den "dense bodies" (DB) sind deutliche elektronendichte Präzipitate zu finden. Die Endomembransysteme werden durch diese Methode schlecht erhalten. Das "dense tubular system" (DTS) ist nicht sicher auszumachen (? DTS). Daher können Präzipitate in diesen Strukturen nicht beurteilt werden.
(Maßstab = 1 µm)

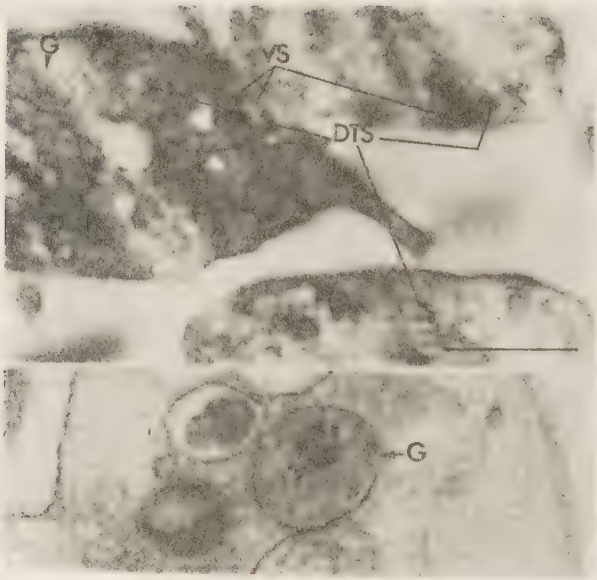

Abb. 4a: Kalziumfällung durch Ammoniumoxalat im unstimulierten Thrombozyten. Diese Methode führt zu wenig elektronendichten Präzipitaten in Membrannähe, die im "dense tubular system" (DTS) deutlicher hervortreten.
(VS = Vesikelsystem, G = Granula)
(Maßstab = 1 µm)

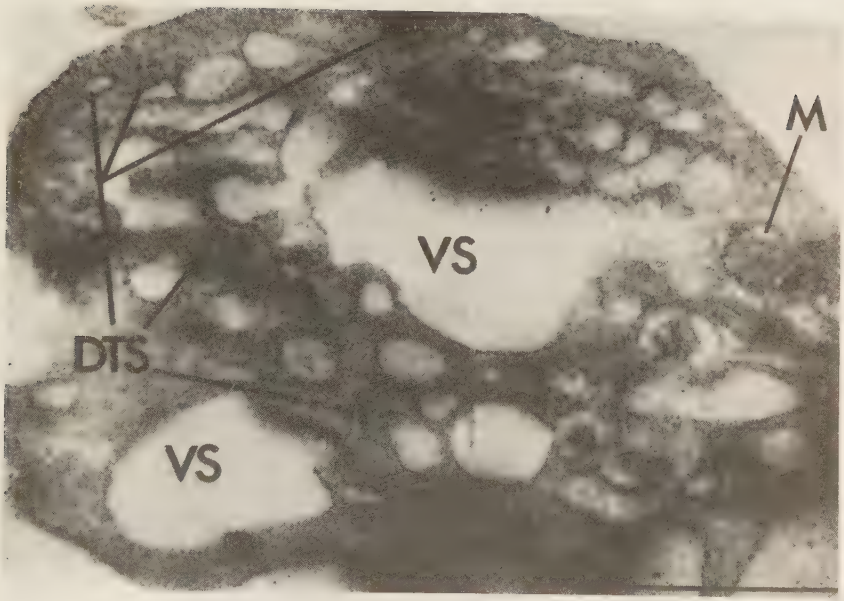

Abb. 4b: Kalziumfällung durch Ammoniumoxalat im Thrombin-degranulierten Thrombozyten.
Es sind deutliche Präzipitatniederschläge im "dense tubular system" (DTS) zu erkennen.
(VS = Vesikelsystem, M = Mitochodrium)
(Maßstab = 1 µm)

Abb. 5: Tannin-fixiertes, gewaschenes Plättchen.
Die Oberfläche ist mit einer bis zu 50 nm dicken Schicht feiner Filamente bedeckt.

4.2 Aggregation von nicht-stimulierten und Thrombin-degranulierten Thrombozyten

Die gewaschenen, unstimulierten Plättchen aggregieren nach Zugabe von Adenosindiphosphat, Kollagen und Thrombin. Für die Reaktion in Gegenwart von ADP ist Fibrinogen notwendig.

Thrombin-degranulierte Plättchen reagierten nach Zugabe von Kollagen und ADP in Gegenwart von Fibrinogen. Im Vergleich zu den unstimulierten Thrombozyten war die Oszillation deutlich abgeschwächt. Nach Angaben von O'BRIEN und HEYWOOD ist die Oszillation am größten, wenn die Plättchen ihre normale, diskoide Form besitzen (98). Auch die Transmissionsabnahme nach Zugabe des Stimulans als Ausdruck des Überganges von der diskoiden in eine kugelige Form ist deutlich vermindert oder nicht nachweisbar.

4.2.1 durch Thrombin

Nach Zugabe von Thrombin (Endkonz. 1 U/ml) reagierten die unstimulierten Plättchen prompt mit Änderung ihrer Gestalt ("shape change"), sichtbar an einer kurzfristigen Oszillationsabnahme. Danach kommt es zu einer steilen Zunahme der Transmission, die unter Auftreten grober Oszillationen - bedingt durch die Aggregatbildung - einem Maximum zustrebt.

Bei den Thrombin-degranulierten Plättchen bewirkt erneuter Thrombinkontakt in keinem Experiment eine Formänderung oder Aggregation (Abb. 6).

4.2.2 durch Kollagen

Die Reaktion nach Zugabe von Kollagen (Endkonz. 5 µl = 1 µg/ml bzw. 20 µl = 4 µg/ml) war bei den unstimu-

lierten Plättchen im Vergleich zur Thrombin- und ADP-Wirkung deutlich verzögert. Auch die Formänderung verlief sehr viel träger. Die Transmissionszunahme, d.h. die Aggregation, war ähnlich schnell wie bei den beiden anderen Substanzen.

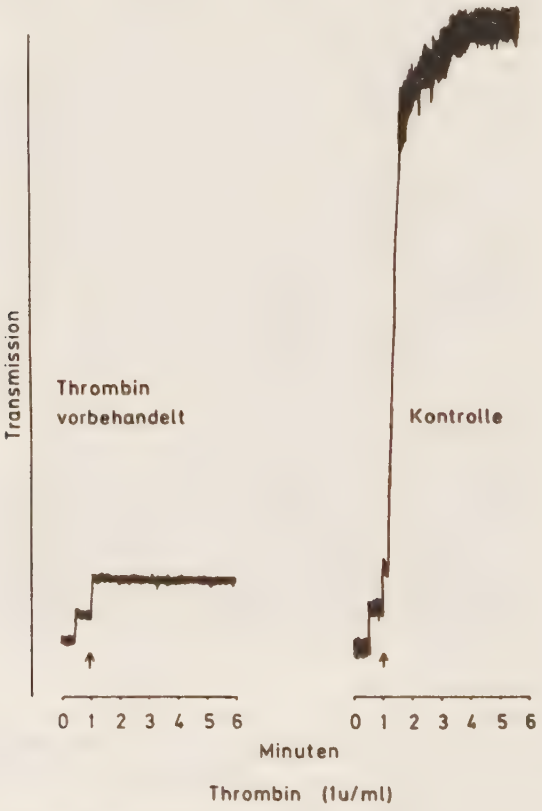

Abb. 6: Thrombin-induzierte Aggregation von degranulierten und unstimulierten Thrombozyten. Die nicht stimulierten Plättchen aggregieren prompt auf Zugabe von Thrombin (1 U/ml). Die zuvor durch Thrombin (1 U/ml) degranulierten Plättchen zeigen sich dagegen nach erneutem Thrombinkontakt gegenüber vollkommen refraktär.

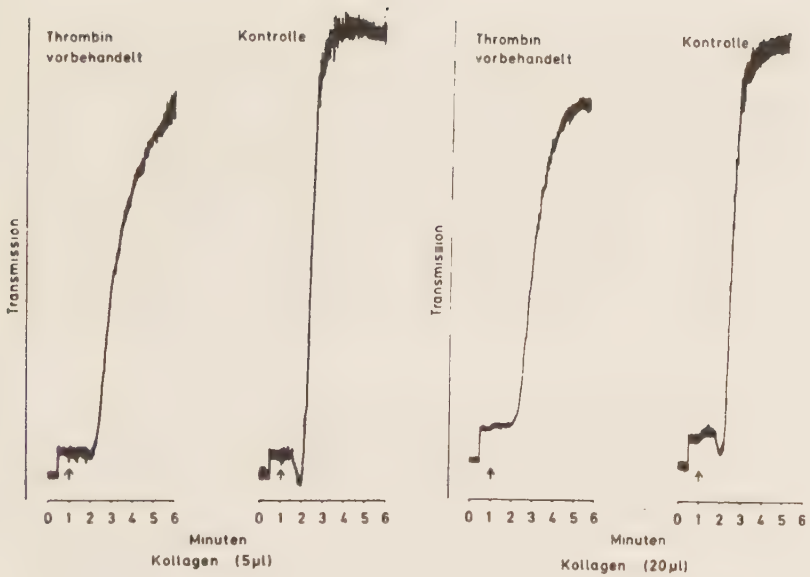

Abb. 7: Kollagen-induzierte Aggregation von Thrombin-degranulierten und unstimulierten Thrombozyten (1 µg/ml = 5 µl bzw. 4 µg/ml = 20 µl). Sowohl die nicht stimulierten als auch die degranulierten Plättchen reagieren mit einer gewissen Latenzzeit mit Aggregation und Freisetzung. Allerdings scheint das Ausmaß der Reaktionen bei den Thrombin vorbehandelten Zellen etwas geringer zu sein.

Die Empfindlichkeit gegenüber niedrigen Kollagenkonzentrationen (1 µg/ml) erscheint bei den Thrombin-degranulierten Plättchen vermindert. Die Transmissionszunahme nach Kollagen war in allen Versuchen kleiner als bei den unstimulierten Kontrollplättchen (Abb. 7).

4.2.3 durch ADP

Die Antwort auf ADP (Endkonz. 10^{-5} Mol/l), nämlich "shape change" und Transmissionszunahme gleichen bei den unstimulierten Zellen formal der Thrombinreaktion. Im Gegensatz zur Thrombin- und Kollagenwirkung kommt es nach Erreichen eines Transmissions- und Oszillationsmaximum zu einer Abnahme der Lichtdurchlässigkeit, bedingt durch eine spontane Desaggregation. Die Reaktion auf eine geringere ADP-Konzentration (10^{-6} Mol/l) löste in vielen Experimenten entweder nur eine schwache Aggregation aus, oder es war überhaupt kein Effekt sichtbar (Abb. 8).

Die Reaktion Thrombin-degranulierter Plättchen auf ADP-Konzentrationen von 10^{-5} Mol/l ist entweder vergleichbar der von unstimulierten oder verstärkt. Teilweise fehlt die spontane Desaggregation (Abb. 9).

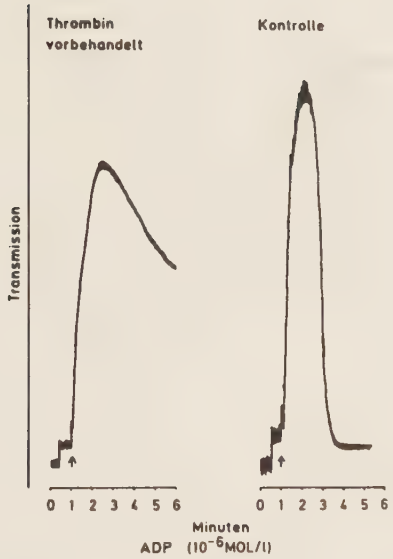

Abb. 8: ADP-induzierte Aggregation von Thrombin-degranulierten und unstimulierten Kontrollplättchen (Konz. 10^{-6} Mol/l). In beiden Fällen kommt es zur spontanen, reversiblen Aggregation. Im Gegensatz zu den Experimenten mit höheren ADP-Konzentrationen kam es in keinem Fall zu einer irreversiblen Aggregation oder Freisetzungsreaktion der Thrombin-vorbehandelten Zellen.

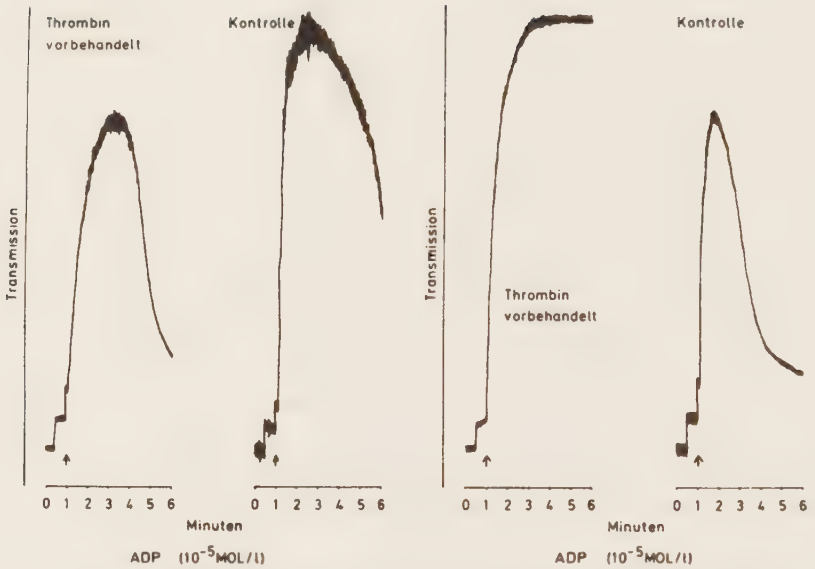

Abb. 9: ADP-induzierte Aggregation von Thrombin-degranulierten und unstimulierten Thrombozyten (Konz. 10^{-5} Mol/l). Die Kontrollplättchen zeigen in beiden Experimenten eine völlige Reversibilität der Aggregation. Bei den Thrombin-degranulierten Plättchen ergibt sich ein unterschiedliches Verhalten. Während die Antwort auf die ADP-Stimulation im linken Experiment der der Kontrolle ähnlich ist, kommt es im zweiten Experiment (rechts) zur irresersiblen Aggregation und zur Freisetzungsreaktion.

4.3 Freisetzung von Serotonin aus nicht-stumulierten und Thrombin-degranulierten Thrombozyten

4.3.1 Serotoninaufnahme von unstimulierten Thrombozyten

Die endgültige Plättchenkonzentration betrug im 2.-4. Versuch 5 x 10^5/ µl. Im ersten Experiment mußte die Suspension wegen geringer Plättchenausbeute verdünnt werden, so daß die Zellzahl und auch die ^{14}C-Serotoninkonzentration nur 33% der übrigen Versuche betrug.

Tabelle 1:

Vers. Nr.	Gesamt-Rd	Überst. Rd	Differenz (= 100%)	Aufnahme (%)
1	5934,7	133,6	5831,1	98,3
	6613,7	55,4	6558,4	99,2
2	17152,6	71,3	17081,3	99,6
	18218,5	62,3	18156,2	99,7
3	19157,0	97,9	19059,1	99,5
	19801,9	101,8	19700,1	99,5
4	19047,6	1400,1	17647,5	92,7
	18181,8	1481,9	16699,9	91,8

Serotoninaufnahme durch unstimulierte Plättchen:
Die Zahlenangaben der Spalten 2,3 und 4 entsprechen counts pro minutes. Die Differenz (Spalte 4) aus der Gesamtradioaktivität der Suspension (Spalte 2) und der Radioaktivität im zellfreien Überstand (Spalte 3) nach Abzentrifugieren der Plättchen ergibt die ^{14}C-Serotoninaufnahme durch die Thrombozyten. Dieser Wert entspricht dem 100%-Wert bei den Freisetzungsexperimenten. In Spalte 5 ist dieser Betrag als prozentualer Anteil

der zugefügten Gesamtradioaktivität angegeben. Im ersten Versuch war wegen geringerer Plättchenausbeute bei der Präparation nur ein Drittel der Zellzahl und der Radioaktivität im gleichen Suspensionsvolumen. Im Versuch Nr. 4 ist von den Plättchen deutlich weniger ^{14}C-Serotonin aufgenommen worden.

Es sind immer Doppelbestimmungen durchgeführt worden.

In drei Experimenten lag die ^{14}C-Serotoninaufnahme, errechnet aus der Differenz der Gesamtradioaktivität und der Radioaktivität, die nach Abzentrifugieren der Zellen im plättchenfreien Überstand verblieben war, um 99%. Lediglich im vierten Versuch war die Aufnahme des Amins auffallend geringer (Tab. 1).

Tabelle 2:

Vers. Nr.	Aufnahme Rd (cpm)	Leerwert Rd (cpm)	Leerwert (%)
1	5934,7	70,2	1,2
	6613,7	145,5	2,1
2	17081,3	199,3	1,2
	18156,2	198,6	1,1
3	19059,1	18,1	0,1
	19700,1	28,9	0,2
4	17647,5	697,2	4,0
	16699,9	476,1	2,9

Unspezifischer Serotoninverlust von gewaschenen unstimulierten Plättchen durch die Versuchsanordnung. Spalte 2 zeigt die von den Zellen aufgenommene ^{14}C-Serotoninmenge in counts/min (vgl. auch Tab. 1, Spalte 4). Die Spalten 3 und 4 zeigen das Ausmaß der Freisetzung in cpm bzw.

in Prozent der aufgenommenen Serotoninmenge. In der Spalte "Leerwert (cpm)" ist von den tatsächlichen counts die Überstandsaktivität abgezogen worden.

Durch Bestimmung eines Leerwertes wurde der unspezifische Serotoninverlust in der Versuchsanordnung im Aggregometer bestimmt, der durch mechanische Verletzung der Zellen durch den Magnetführer und ähnliche Prozesse bedingt war. Unter der Voraussetzung, daß auch bei den Freisetzungsexperimenten ein gleich großer Prozentsatz an Zellen zerstört wurde bzw. die gleichen unspezifischen Freisetzungsmechanismen ablaufen, wurde bei jedem einzelnen Experiment der entsprechende Leerwert abgezogen (Tab. 2).

4.3.2 Thrombin-induzierte Freisetzung aus unstimulierten Thrombozyten

Zu je 1 ml einer gewaschenen Thrombozytensuspension wurden 100 µl Thrombinlösung verschiedener Konzentration gegeben, so daß die Endkonzentration zwischen 0,5 und 5 U/ml Suspension lagen. Die Serotoninfreisetzung der ersten drei Minuten wurde gemessen.

Wie aus Tabelle 3 und Abbildung 10 zu ersehen ist, war das Ausmaß der Serotoninfreisetzung abhängig von der Konzentration an Thrombin in der Suspension.

Eine vollständige Entspeicherung wurde in keinem Experiment erreicht.

4.3.3 Kollagen-induzierte Freisetzung aus unstimulierten Thrombozyten

Die Freisetzungsexperimente induziert durch Kollagen wurden in gleicher Weise wie oben beschrieben ausgeführt. Bei der Berechnung der prozentual freigesetzten

Tabelle 3:

Vers. Nr.	Thrombin 0,5U (cpm)	%	Thrombin 1 U (cpm)	%	Thrombin 1,5U (cpm)	%	Thrombin 2 U (cpm)	%	Thrombin 3 U (cpm)	%	Thrombin 5 U (cpm)	%
1	2983,2	66,3	3451,8	77,0	3275,4	73,0	3506,3	78,3	3559,8	79,5	3903,2	87,4
	2974,4	59,1	3407,1	67,8	3365,8	67,0	3579,0	71,3	3288,3	65,5	3913,8	78,0
2	5086,4	39,3	8271,2	61,1	8673,0	67,3	9099,1	70,6	9813,5	76,2	9737,0	75,6
	9689,9	70,6	8326,3	60,1	8230,4	59,9	9345,7	68,1	9328,3	67,9	9624,4	70,1
3	7680,4	53,2	9293,6	64,5	10288,0	71,5	10101,0	70,2	11210,7	77,9	11587,4	80,5
	6377,5	42,6	9652,5	64,8	10183,2	68,4	10845,9	72,9	11086,4	74,5	12254,9	82,4
4	13003,9	65,8	15128,5	77,8			15552,0	80,2	15698,5	81,0	15527,9	80,1
	8756,5	43,6	12300,1	64,7			14947,0	80,1	15873,0	86,2	16556,2	92,3

^{14}C-Serotoninfreisetzung durch steigende Thrombinkonzentrationen aus gewaschenen unstimulierten Thrombozyten. In den Spalten "(cpm)" sind die Nettocounts angegeben. Die Spalten "%" geben die freigesetzte Serotoninmenge als prozentualen Anteil der aufgenommenen Radioaktivitätsmenge wieder. Im vierten Versuch ist keine Messung mit Thrombin 1,5 U/ml durchgeführt worden.
Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist auch mit sehr hohen Thrombinkonzentrationen keine vollständige Entspeicherung zu erreichen.

Bei jedem Versuch sind Doppelbestimmungen vorgenommen worden.

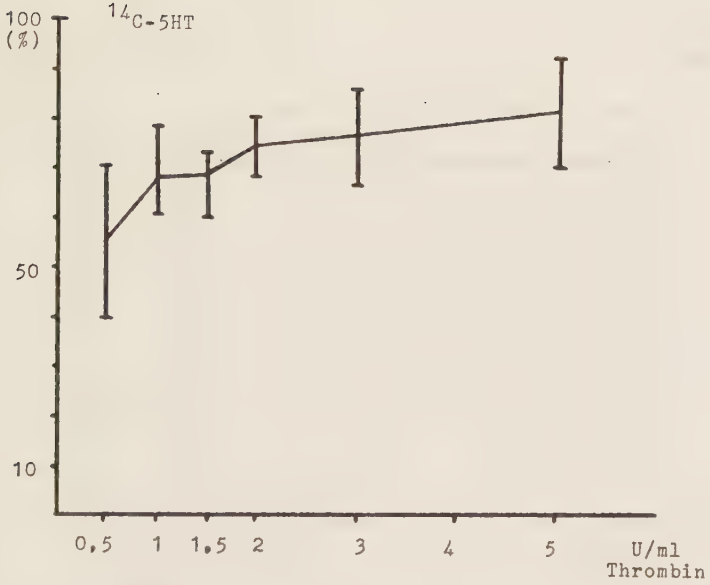

Abb. 10: Graphische Darstellung der Mittelwerte der prozentualen ^{14}C-Serotoninfreisetzung in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration. Außerdem wurde der Streubereich der 4 Versuche aufgetragen (vgl. Tab. 3). Auf der Abzisse sind die Thrombinkonzentrationen in U/ml angegeben, auf der Ordinate das Ausmaß der ^{14}C-Serotoninfreisetzung in Prozent der aufgenommenen Radioaktivitätsmenge.

Serotoninmenge sind die verschiedenen Volumina der zugefügten Kollagenlösungen berücksichtigt.

Wie aus Tabelle 4 und Abbildung 11 hervorgeht, ist auch der Kollageneffekt konzentrationsabhängig. Im Vergleich zu Thrombin ist die Freisetzungsrate des radioaktiven Amins aber geringer.

Tabelle 4:

Vers. Nr.	Kollagen 1 µg (cpm)	%	Kollagen 4 µg (cpm)	%	Kollagen 10 µg (cpm)	%
1	2097,3	42,3	2918,0	59,9	3221,6	66,9
	2094,2	38,1	2853,0	45,4	3121,0	58,9
2	5844,5	41,6	7347,5	52,6	7326,0	53,0
	6329,1	42,4	7733,9	54,1	8032,1	54,5
3	3105,5	19,5	7751,9	49,7	9009,0	58,3
	3667,0	22,4	6626,9	41,0	8976,6	56,2
4	10141,9	47,8			13850,4	65,8

^{14}C-Serotoninfreisetzung aus gewaschenen unstimulierten Thrombozyten durch steigende Kollagenkonzentrationen. In den Spalten "(cpm)" sind die Nettocounts eingetragen. Die Spalten "%" geben die freigesetzte Serotoninmenge als prozentualen Betrag der aufgenommenen Radioaktivitätsmenge wieder. Im vierten Experiment wurde keine Messung mit 4 µg Kollagen und keine Doppelbestimmung durchgeführt.
Die Tabelle zeigt, daß durch steigende Kollagenkonzentrationen vermehrt Serotonin freigesetzt werden kann, das Ausmaß erreicht aber nicht das der Thrombinstimulation.

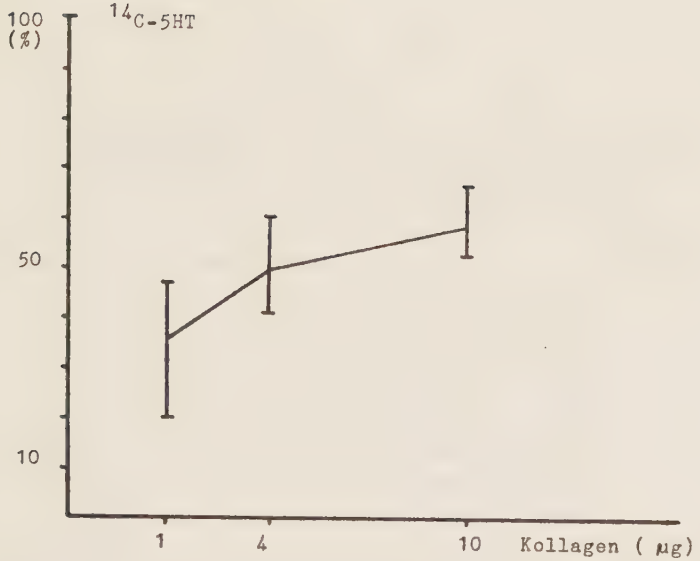

Abb. 11: Graphische Darstellung der Mittelwerte der prozentualen ^{14}C-Serotoninfreisetzung in Abhängigkeit von der Kollagenkonzentration. Außerdem wurde der Streubereich der vier Versuche aufgetragen (vgl. Tab. 4). Auf der Abzisse sind die Kollagenkonzentrationen in µg aufgetragen, auf der Ordinate das Ausmaß der ^{14}C-Serotoninfreisetzung in Prozent der zuvor aufgenommenen Radioaktivitätsmenge.

4.3.4 ADP-induzierte Freisetzung aus unstimulierten Thrombozyten

Adenosindiphosphat bewirkt eine reversible Aggregation, aber keine oder nur eine geringfügige Serotoninfreisetzung durch unstimulierte Plättchen (Tab. 5).

Tabelle 5:

Vers. Nr.	ADP 10^{-6} Mol/l (cpm)	%
1	879,2	2,8
	2290,0	5,0
2	805,1	5,1
	737,3	4,5

ADP-induzierte ^{14}C-Serotoninfreisetzung aus unstimulierten Thrombozyten. In der Spalte "(cpm)" sind die Nettocounts angegeben, in der Spalte "%" die freigesetzte Serotoninmenge in Prozent des zuvor aufgenommenen Betrages.
Im Vergleich zu Thrombin und Kollagen findet nach ADP-Stimulation kaum eine Freisetzung statt.

4.3.5 Vergleich der Freisetzungsreaktionen von Thrombin-degranulierten und unstimulierten Thrombozyten

Die ^{14}C-Serotonin-Aufnahme durch die Plättchen vor Thrombinstimulation war nahezu vollständig (vgl. Tab. 6, Spalte 4). Nach Stimulierung mit Thrombin (1U/ml) wurden $63,9 \pm 12,5\%$ (n=14) der zuvor aufgenommenen Serotoninmenge wieder freigesetzt (Tab. 6, Spalte 3 und 4).

30 - 60 Minuten nach Thrombinstimulierung - zu diesem Zeitpunkt waren die Plättchen wieder vollständig des-

aggregiert - haben die stimulierten Zellen fast die gesamte freigesetzte ^{14}C-Serotoninmenge wieder aufgenommen. Die Berechnung des intrazellulären Serotoningehaltes aus der Gesamtradioaktivität der Suspension und der Radioaktivität im zellfreien Überstand der degranulierten und der unstimulierten Plättchen zeigte keinen signifikanten Unterschied (vgl. Tab. 7, Spalte 4 und 5).

Da die Thrombozytenkonzentration von 1,5 x 10^6 Zellen/ µl vor dem letzten Waschvorgang auf 1 x 10^6 Zellen/ µl in der letzten Suspension verringert worden war, vermindert sich die Serotoninkonzentration erwartungsgemäß von etwa 99% auf 63,9% des Ausgangswertes.

In allen Experimenten war die Radioaktivitätsmenge im Suspensionsmedium der Proben Thrombin-stimulierter Plättchen höher als in den Proben unstimulierter Kontrollplättchen.

Vor den Freisetzungsexperimenten wurde wieder die intrazelluläre ^{14}C-Serotoninmenge sowie ein Leerwert bestimmt (Tab. 8). Diesmal zeigte sich ein deutlicher unspezifischer Verlust von Radioaktivität, dessen Größenordnung in den einzelnen Versuchen stark variiert.

Die Experimente zeigen, daß die Thrombin-degranulierten Thrombozyten vollständig unempfindlich gegenüber einem erneuten Thrombinkontakt sind. Es wird weder eine Aggregation noch eine Freisetzung ausgelöst.

Nach Zugabe von Kollagen setzten die Thrombin-degranulierten Plättchen zwar deutlich weniger ^{14}C-Serotonin frei als die unstimulierten Kontrollzellen, es findet aber noch eine deutliche Sekretion statt.

In Gegenwart von ADP verhalten sich beide Thrombozyten-

Tabelle 6:

Vers. Nr.		Gesamt- Rd cpm	Überst.1 Rd cpm	Aufn. %	Überst.2 Rd cpm	Freis. %
1	A	16680,1	111,2	99,3	12000,0	72,0
	B	16839,5	110,4	99,3	95,3	0,6
2	A	10288,0	65,5	99,4	5115,0	50,0
	B	10288,0	65,5	99,4	90,2	0,9
3	A	13440,8	158,3	99,8	8116,8	60,1
	B	18484,2	112,8	99,4	65,9	0,4
4	A	13123,3	320,0	97,6	7496,2	57,0
	B	12610,3	576,5	95,4	685,5	5,4
5	A	11363,3	147,0	98,7	11299,4	99,4
	B	14880,9	98,7	99,3	78,3	0,5
6	A	9328,3	103,3	98,9	6016,8	64,5
	B	8992,8	98,9	98,9	86,0	0,9
7	A	15698,5	225,5	98,6	7092,1	45,0
	B	16528,9	211,7	98,7	182,6	1,1

^{14}C-Serotoninaufnahme und Freisetzung nach Stimulierung mit Thrombin (1 U/ml).
Mit "A" sind die degranulierten Proben gekennzeichnet, mit "B" die unstimulierten Kontrollplättchen.
Die Aufnahme vor Stimulation ist bei allen Thrombozyten nahezu vollständig (Spalte 4).
Überstandradioaktivität 2 (cpm) und Freisetzung (%) - Spalte 5 und 6 - zeigen die freigesetzte Serotoninmenge 3 Minuten nach Stimulation in Nettocounts bzw. Prozent der von den Zellen vorher aufgenommenen Menge.
Die unterschiedliche absolute Radioaktivitätsmenge - siehe z.B. Vers. 6 und 7 - ist zum Teil durch eine unterschiedliche Zellzahl in den Suspensionen bedingt.

Tabelle 7:

Vers. Nr.		Gesamt-Rd cpm	Überst. Rd cpm	intrazell. Rd cpm	%
1	A	10731,6	702,4	10028,8	60,5
	B	10916,6	54,4	10862,2	64,5
2	A	6045,9	285,8	5760,1	56,3
	B	6702,4	125,5	6576,9	64,3
3	A	9047,8	234,7	8813,1	66,3
	B	11933,1	138,9	11794,2	64,5
4	A	7315,2	601,3	5623,9	52,4
	B	5685,0	61,1	6713,9	46,7
5	A	10615,7	1241,7	9374,0	83,5
	B	10729,6	60,9	10668,7	72,2
6	A	5903,1	463,7	5439,4	58,9
	B	5157,2	46,0	5111,2	57,5
7	A	10793,3	1213,0	9580,3	61,0
	B	11870,8	374,7	11496,1	69,5

^{14}C-Serotoninmenge der degranulierten (A) und der unstimulierten (B) Thrombozyten 30-60 Minuten nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml), d.h. nach vollständiger Desaggregation und erneutem Waschvorgang, errechnet aus der Gesamtradioaktivität der Suspension in "cpm" (Spalte 2) und des zellfreien Überstandes in "cpm" (Spalte 3). Die Spalten 4 und 5 zeigen den intrazellulären ^{14}C-5 HT-Gehalt in "cpm" bzw. Prozent der ursprünglich aufgenommenen Menge (vgl. Tab. 6). Es muß berücksichtigt werden, daß die Plättchenkonzentration beim letzten Aufschwemmen um 30% verringert wurde (Endkon. 1 x 10^6 Zellen/ µl).

Tabelle 8:

Vers. Nr.		Gesamt-Rd cpm	Überstand cpm	%	100% cpm	Leerwert cpm	%
1	A	4091,3	447,3	89,0	3644,0	499,9	1,5
	B	3675,4	486,6	86,7	3188,8	480,5	/
2	A	2451,5	236,3	90,3	2215,2	332,0	4,3
	B	2545,8	340,8	86,6	2205,0	646,7	13,8
3	A	4427,6	145,4	96,7	4282,2	216,4	1,6
	B	4349,7	101,4	97,6	4248,3	254,3	3,6
4	A	3086,4	283,1	90,8	2803,3	851,5	20,3
	B	2940,3	490,5	83,3	2449,8	402,2	/
5	A	4340,3	803,1	81,5	3537,2	1002,7	5,6
	B	4363,0	152,0	96,5	4211,0	660,5	12,1
6	A	2279,9	432,4	81,0	1847,5	985,7	29,9
	B	2453,9	120,1	95,1	2333,8	347,6	9,7
7	A	5208,3	1029,3	80,1	4179,0	1562,9	12,8
	B	8012,8	193,8	97,5	7819,0	416,3	2,8

^{14}C-Serotoningehalt und unspezifischer Verlust des Amins durch dreiminütiges Rühren im Aggregometer ohne Zusatz eines Stimulans (Leerwert) von Thrombin-degranulierten (A) und unstimulierten (B) Thrombozyten. Die Zellzahl beträgt 5 x 10^5/ ul.
Der totale ^{14}C-5 HT-Gehalt der Thrombozyten, d.h. der 100%-Wert (Spalte 5), aus dem der Leerwert in "cpm" (Spalte 6) bzw. in Prozent (Spalte 7) errechnet wurde, ist gebildet aus der Differenz der Gesamtradioaktivitätsmenge in der Suspension (Spalte 2) und dem zellfreien Suspensionsmedium, d.h. dem Überstand (Spalte 3). In den Versuchen 1B und 4B konnte keine prozentuale Angabe des Leerwertes gemacht werden, da die Überstandsradioaktivität höher lag.

Tabelle 9:

Vers. Nr.		Thrombin 1 U (cpm)	%	Kollag. 1 ug (cpm)	%	Kollag. 4 ug (cpm)	%	Kollag. 10 ug (cpm)	%	ADP 10^{-5} Mol/l (cpm)	%	ADP 10^{-6} Mol/l (cpm)	%
1	A	353,9	0,2	659,6	5,9	1050,5	16,8			548,6	1,4	429,9	0,0
	B	3196,1	84,8	2888,8	75,2	3615,5	88,0			330,3	0,0	435,9	0,0
2	A	247,8	0,0	1047,9	33,8	1386,5	49,8			629,5	9,5	331,7	0,0
	B	1941,7	68,2	2793,1	99,0	2274,2	85,7			273,0	0,0	403,0	0,0
3	A	185,2	0,0	498,5	0,7					263,2	0,7	253,4	0,4
	B	3720,0	84,6	1021,6	18,7					144,5	0,1	279,1	3,4
4	A	390,9	0,0			1319,9	21,0	1506,6	29,2	1353,3	22,5	713,7	0,0
	B	2806,6	91,3			2424,5	76,2	2764,2	89,6	277,9	0,0	364,2	0,0
5	A	1027,0	0,7			1316,6	9,4	1875,7	26,2	1280,4	0,8	1016,8	0,4
	B	3828,0	85,5			3781,9	84,3	4590,7	99,0	196,3	0,0	198,9	0,0
6	A	318,5	0,0	545,6	3,8	689,8	13,9	1079,2	35,0	985,7	29,9	465,4	1,8
	B	2012,0	73,5	1956,7	68,9	2073,5	73,9	2111,0	75,6	162,2	1,8	135,7	0,7
7	A	1056,5	0,0	1655,1	2,6	2932,9	37,6	2073,2	14,0	2597,4	28,3	1254,3	0,0
	B	6090,1	74,7	3074,6	35,9	5760,3	70,3	5097,5	61,6	515,9	1,3	310,9	0,0

Freigesetzte Serotoninmenge nach Aktivierung mit Thrombin, Kollagen und ADP aus Thrombin-degranulierten (A) und unstimulierten (B) Plättchen, angegeben in "cpm" und Prozent der intrazellulären Serotoninmenge (s. Tab. 8). Bei den Angaben in "cpm" müssen der Leerwert und die extrazelluläre Radioaktivität des Suspensionsmedium berücksichtigt werden, bei den Prozentangaben sind diese Werte schon einkalkuliert. Wegen Mangel an Plättchenmaterial konnten nicht alle Freisetzungsreaktionen durchgeführt werden.
In den Versuchen 4A, 6A und 7A scheint nach Stimulation mit ADP 10^{-5} eine Freisetzungsreaktion stattgefunden zu haben.

proben gleichartig. Sie zeigen eine deutliche Aggregation, es kommt aber nicht zur Aminfreisetzung. Allerdings war bei drei Experimenten (Nr. 4, 6 und 7) nach Zugabe hoher ADP-Konzentrationen bei den Thrombin-degranulierten Plättchen eine ^{14}C-Serotoninfreisetzung zu beobachten. Die gleichzeitig registrierten Aggregationskurven ließen eine Wiederauflösung der Aggregate im Beobachtungszeitraum vermissen.

4.4 Kalziumgehalt der Thrombozyten vor und nach Aktivierung durch Thrombin

Der Kalziumgehalt von Thrombin-degranulierten Plättchen (A) und unstimulierten Humanthrombozyten (B) wurde gemessen. Bei jedem Experiment wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und vor jeder Messung eine Eichkurve erstellt.

Der Kalziumgehalt der unstimulierten, gewaschenen Humanthrombozyten beträgt 8,7 $\pm$ 0,8 µg Ca/10^9 Plättchen entsprechend 217 $\pm$ 20 nmol. Das Gesamtkalzium der Thrombin-degranulierten Thrombozyten liegt bei 3,9 $\pm$ 0,7 µg Ca/10^9 Plättchen entsprechend 97 $\pm$ 17 nmol.

Durch die Reaktionsabläufe während der Thrombineinwirkung verlieren die menschlichen Thrombozyten etwa 55% ihres Gesamtkalziumgehaltes.

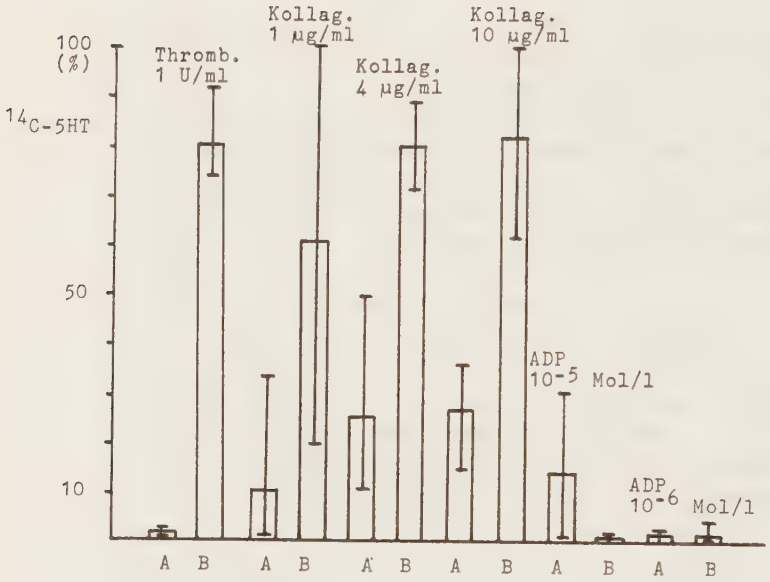

Abb. 12: Graphische Darstellung der ^{14}C-Serotoninfreisetzung aus Thrombin-degranulierten (A) und unstimulierten (B) Thrombozyten.
Auf der Ordinate ist die ^{14}C-5 HT-Menge, die sezerniert wurde, in Prozent eingetragen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte aus allen sieben Versuchen sowie die Streubreite.
Das Bild der ADP-Stimulierung (10^{-5} Mol/l) der degranulierten Plättchen erscheint dadurch verzerrt, daß in drei Experimenten eine irreversible Aggregation und Freisetzung stattgefunden hat.

Tabelle 10:

Vers. Nr.	Probe A µg Ca		Probe B µg Ca		Rest-Ca %	
1	3,9	4,2	7,7	7,9	50,6	53,2
2	3,8	4,1	9,2	9,4	41,3	43,6
3	3,5	3,7	8,9	9,0	39,3	41,1

Kalziumgehalt der Thrombozyten vor (A) und nach (B) Stimulation mit Thrombin (1 U/ml) gemessen mit der Atomabsorptionsphotometrie. Die Spalten 2("Probe A") und 3 ("Probe B") enthalten Doppelbestimmungen der einzelnen Experimente in µg Kalzium/10^9 Plättchen. Die Spalte 4 ("Rest-Ca") zeigt den prozentualen Anteil des Kalzium, das nach Aktivierung in den Plättchen verblieben war.

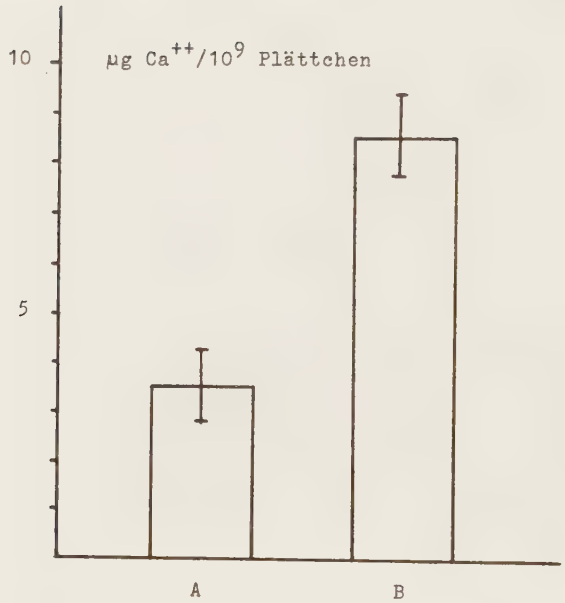

Abb. 13: Graphische Darstellung des Kalziumgehaltes von Thrombozyten vor (Säule A) und nach (Säule B) Stimulation mit Thrombin (1 U/ml). Angegeben sind die Mittelwerte aus vier Versuchen sowie die Streubreite. Durch Thrombinstimulation verlieren die Plättchen etwa 55% ihres Kalziumbestandes.

4.5 Kalziumaufnahme von Thrombin-degranulierten und unstimulierten Thrombozyten

Die Ergebnisse der Kalziumaufnahme zeigen, daß sowohl degranulierte wie auch unstimulierte Plättchen kontinuierlich geringe Kalziummengen aus der Umgebung aufnehmen bzw. austauschen. Nach einer Inkubationsdauer von sechs Minuten hatten die degranulierten Thrombozyten im Mittel 82,6 nmol Kalzium/10^{11} Plättchen aufgenommen, die unstimulierten 86,9 nmol Kalzium/10^{11} Zellen.

Ein signifikanter Unterschied ließ sich zu keinem Zeitpunkt erkennen (s. Tab. 12 und Abb. 14).

Tabelle 11:

Vers. Nr.		Kalzium µg/ml	nmol/ml
1	A	2,1	52,5
	B	1,55	38,8
2	A	1,7	42,5
	B	1,45	36,3
3	A	1,75	43,75
	B	2,4	60,0

Konzentration des"kalten" Kalzium in der Suspensionsflüssigkeit, gemessen mit der Atomabsorptionsphotometrie. Aus dem Verhältnis vom markierten und "kalten" Kalzium in dem Suspensionsmedium wurde die wahre Kalziumaufnahme durch die Thrombozyten berechnet.

Tabelle 12:

Vers. Nr.		Nullw. Rd	Nullw. ^{45}Ca	30 sec Rd	30 sec ^{45}Ca	30 sec Diff	30 sec Ges.	1 min Rd	1 min ^{45}Ca	1 min Diff	1 min Ges.	2 min Rd	2 min ^{45}Ca	2 min Diff	2 min Ges.	4 min Rd	4 min ^{45}Ca	4 min Diff	4 min Ges.	6 min Rd	6 min ^{45}Ca	6 min Diff	6 min Ges.
1	A	15	1,35	20	1,60	0,25	11,0	18	1,50	0,15	6,6	34	2,75	1,40	61,0	42	3,30	1,95	85,3	44	3,60	2,25	98,4
	B	16	1,40	21	1,65	0,25	8,1	24	1,75	0,35	11,4	33	2,70	1,3	42,1	36	2,90	1,50	48,6	46	3,80	2,40	77,8
2	A	16	1,40	20	1,60	0,20	7,1	22	1,65	0,25	8,9	25	2,00	0,60	21,2	35	2,85	1,45	51,3	39	3,20	1,80	63,7
	B	17	1,45	15	1,30	/	/	18	1,50	0,10	3,0	21	1,65	0,25	7,6	35	2,85	1,40	42,3	39	3,20	1,75	52,9
3	A	15	1,35	20	1,60	0,25	9,1	28	2,30	0,95	34,6	24	1,90	0,55	20,1	29	2,30	0,95	34,6	45	3,70	2,35	85,7
	B	11	1,20	16	1,40	0,20	10,0	18	1,50	0,30	15,0	19	1,55	0,35	17,5	29	2,30	1,10	55,0	46	3,80	2,60	130

Kalziumaufnahme von Thrombin-degranulierten und nicht stimulierten Thrombozyten nach einer Inkubationszeit von 30 sec, 1 min, 2 min, 4 min und 6 min.
Die Proben der degranulierten Plättchen sind mit "A", die der nicht stimulierten mit "B" gekennzeichnet. Bei allen Werten ist der Leerwert, der durch das passiv am Filterplättchen absorbierte Kalzium bedingt ist, berücksichtigt. Der Nullwert ("Nullw.") beinhaltet das an der Thrombozytenmembran gebundene Kalzium. Dieser Wert wurde als unspezifische Aufnahme von den folgenden Werten abgezogen.
Die Spalten mit der Bezeichnung "Rd" geben die spezifische und unspezifische Radioaktivitätsaufnahme in cpm wieder. Um die spezifische Aufnahme durch die Plättchen zu erhalten, wurde hiervon der Leerwert abgezogen (s. Spalten"Diff").
Jeder Wert ist gemittelt aus einer dreifachen Bestimmung.

Die Spalten "^{45}Ca" zeigen die Menge an markiertem Kalzium, die von den Zellen aufgenommen wurde (10^{-5}nmol ^{45}Ca/5 x 10^{7} Plättchen). In den Spalten Gesamtkalzium ("Ges.") ist die real aufgenommene Kalziummenge, d.h. die Summe aus markiertem und "kaltem" Kalzium, eingetragen (nmol Kalzium/10^{11} Plättchen).

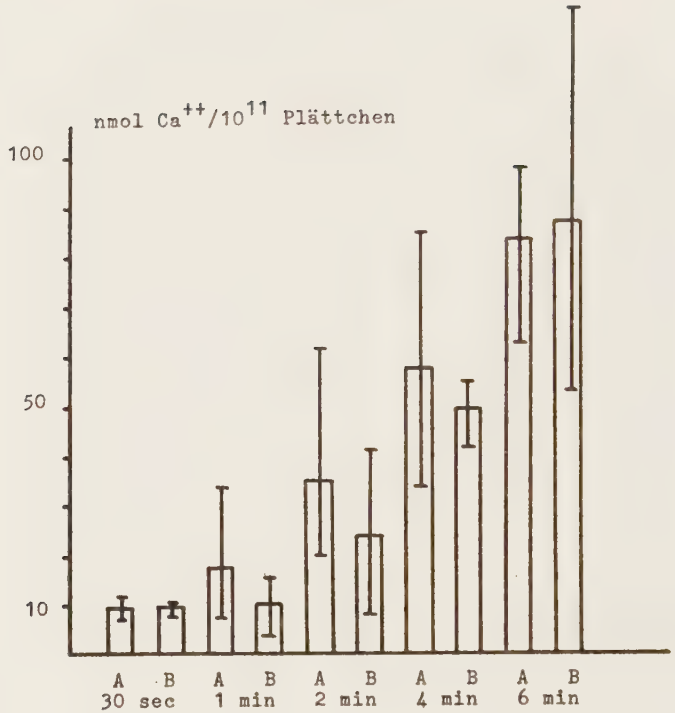

Abb. 14: Graphische Darstellung der durch Thrombin-degranulierte (A) und nicht stimulierte (B) Thrombozyten aufgenommene Kalziummenge.
Die Kalziummenge in nmol/10^{11} Plättchen ist gegen die Zeit in min aufgetragen.
Mit zunehmender Inkubationszeit kommt es zu einer vermehrten Kalziumaufnahme. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Thrombozytengruppen läßt sich nicht feststellen.

5. DISKUSSION

5.1 Veränderungen der Thrombozyten nach Stimulation durch Thrombin

5.1.1 Morphologische Veränderungen

In den gezeigten Experimenten gleicht die äußere Form von unstimulierten und Thrombin/Plasmin-degranulierten Plättchen der von Thrombozyten im Blutplasma. Sie besitzen eine diskoide Form, sowie eine glatte Oberfläche. Nur vereinzelt zeigen die degranulierten Zellen kurze, plump wirkende Pseudopodien. Auch das Zytoplasma der präparierten Thrombozyten zeigt vor der Stimulation die gleiche Organisation wie im Plasma. Nach Thrombin/Plasmin-Degranulation rekonstruieren sich die Mikrotubuli und zeigen die gewohnte zirkuläre Anordnung. An Organellen findet sich das "dense tubular system", Mitochondrien und relativ große Vesikel.

Im Gegensatz zu den hier gefundenen Bildern berichten andere Autoren über profunde morphologische Veränderungen von Thrombin-behandelten Plättchen im Vergleich zu nicht stimulierten Kontroll-Thrombozyten (27, 46, 143). Die wesentliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse wird in der Methode der Präparation zu suchen sein. In den vorliegenden Experimenten ist versucht worden, die Plättchen in einem zwar synthetischen, jedoch in bezug auf die Ionenkonzentration weitgehend physiologischen Medium zu untersuchen.

Die Oberfläche gewaschener Plättchen ist mit Tanninbehandlung als kontinuierliche Glykokalix aus filamentären Strukturen von 30 - 60 nm Länge darstellbar, die dem Proteinanteil an den Oberflächenmolekülen entsprechen dürften. Die Polysaccharid-Anteile der Membranglykoproteine, dargestellt durch Alcianblau, befinden

sich weiter peripher. Der dabei sichtbare plasmalemmnahe Spalt kennzeichnet womöglich eine kohlenhydratfreie Domäne der Plättchenoberfläche. Oberflächenveränderungen durch Thrombinstimulation (und nachfolgende Anwendung von Plasmin z.B.) sind nur nach Alcianblauanwendung sichtbar, nicht nach Tanninbehandlung.

Aus diesen Befunden erhebt sich die Frage, ob die Polypeptidketten der Glykokalixmoleküle bei der Reaktion mit Thrombin etc. überhaupt eine Rolle spielen. Alcianblaubindende Stellen der Glykokalix sind nach bisherigen Kenntnissen saure Mucopolysaccharide, im einzelnen anionische Endgruppen der Kohlenhydratketten, die den polykationischen Farbstoff binden. Diese Gruppen scheinen nach Stimulation für die Alcianblau-Bindung zu fehlen, und manches spricht dafür, daß an diesen Stellen die Thrombinrezeptoren (Plasminrezeptoren?) oder die späteren Fibrinogenbindungsstellen liegen (82, 85).

Das Zytoplasma stimulierter Plättchen läßt Mitochondrien, aber keine "dense bodies" oder α-Granula mehr erkennen. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den unten diskutierten biochemischen und funktionellen Ergebnissen, die ebenfalls eine sehr weitgehende Freisetzung aller in den Speicherorganellen vorhandenen Stoffe sprechen.

In der Außenzone der Plättchen findet man das rekonstruierte Bündel der Mikrotubuli. In dessen Nähe und zwischen anderen Endomembranen sind "dense tubules" vorhanden. Die Anwesenheit dieses Endomembransystems, das auch in Plättchen von Blutgerinnseln noch nachweisbar ist, kann mit seinen weiter unten besprochenen Funktionen (u.a. Kalzium-Akkumulation) erklärt werden. Das Wiederauftreten eines marginalen Bündels von Mikrotubuli in den Thrombin/Plasmin-stimulierten Plättchen

oder die Ausbildung von Mikrotubuli in Plättchen des Gerinnsels setzt voraus, daß eine sehr fein abgestufte Regulation des Kalziumspiegels in Plättchen möglich ist (81).

Das Zytoplasma stimulierter Plättchen enthält weiterhin relativ große Vesikel. Sie entsprechen den Endomembranen des sog. "surface connected" oder "open canalicular system", einem exo- und endozytotisch wirksamen System der Zellen, das mit der Oberfläche Kontakt hat (81).

In Plättchen des Blutgerinnsels ist dieses Vesikelsystem zumindest in diesem Umfange nicht vorhanden. Sein Auftreten in den Plättchen unserer Präparation muß daher besondere Gründe haben. Möglicherweise ist Membranmaterial aus dem umfangreichen Plasmalemm der mit vielen Pseudopodien ausgestatteten Plättchen während der Thrombin/Plasmin-Stimulation Ursache der Vesikel. Andererseits könnten Endozytose-Vorgänge der degranulierten Plättchen die Ursache sein.

Die Glykogengranula, die im Vergleich mit Plättchen im Plasma bei den gewaschenen Thrombozyten schon deutlich vermindert sind, werden in ihrem Bestand nach Stimulation mit Thrombin und Plasmin noch weiter reduziert. Da sie einen Energiespeicher der Zellen darstellen, zeigt ihr Verschwinden, daß die Plättchen sowohl während der Präparation, bei der sie z.B. durch das Zentrifugieren aber auch durch das Wiederaufschwemmen in frischer Suspensionsflüssigkeit enormen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind, als auch durch Thrombinstimulierung Energie in Form von Glukose verbrauchen (26).

Der morphologische Kalziumnachweis in gewaschenen, unstimulierten Plättchen bestätigt die Befunde anderer Autoren, daß der Hauptanteil dieses Kations in den "dense bodies" lokalisiert ist (15, 16, 24, 79, 128,

143). Die α-Granula enthalten ebenfalls einen Teil des Plättchenkalziums (128). Die eben nachweisbaren Kalziumniederschläge im "dense tubular system" der stimulierten und unstimulierten Plättchen stehen in Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß das DTS die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums der Muskelzelle in den Plättchen wahrnimmt.

5.2 Biochemische Veränderungen

5.2.1 Serotoninaufnahme

Die gewaschenen Plättchen nahmen mit Ausnahme von einem Experiment über 98% des radioaktiv markierten Serotonins aus dem Suspensionsmedium auf. Auch BORN et al. berichten von einer nahezu kompletten Aufnahme dieses Amins (7). Wie gezeigt werden konnte, ist die Serotoninspeicherkapazität beim menschlichen Plättchen nur zu einem geringen Teil ausgenutzt (117). Da es nach Serotoninbehandlung zur Vermehrung der "dense bodies" kommt (18, 20, 138), muß man annehmen, daß der größte Teil dieser Substanz in die Speichergranula aufgenommen wird.

In einem der hier gezeigten Experimente lag die Serotoninaufnahme nur bei 92%. Dies könnte einmal Folge einer Plättchenschädigung durch die Präparation sein oder einer teilweise abgebauten Radioaktivität der ^{14}C-Serotoninlösung. An dem Transport von Serotonin durch die Membran sind zwei verschiedene Systeme beteiligt, ein aktiver Mechanismus, der der Michaelis-Menten Kinetik gehorcht, und ein passiver mit der Charakteristik der einfachen Diffusion (64, 115). Da in dem erwähnten Experiment die Membranintegrität und die Funktion der Plättchen erhalten war, kann man vermuten, daß der Defekt eher den aktiven Anteil des Transportsystems betroffen hat. Außerdem könnte ein Teil des ^{14}C-Serotonins durch Verstoffwechselung degradiert worden sein.

Degranulierte Plättchen nehmen nach Thrombin-Plasmin-Stimulation in der Erholungsphase das gesamte freigesetzte Serotonin wieder auf, soweit dies mittels der Radioaktivitätsmessung mit ^{14}C-Serotonin beurteilt werden kann. Da die speziellen Speichergranula ihre Inhaltsstoffe weitgehend sezerniert haben, wie sich an Hand der morphologischen Studien und des verminderten Kalziumgehaltes (siehe unten) beweisen läßt, bieten sich für dieses Phänomen zwei Erklärungsmöglichkeiten an:

1. Die Speicherkapazität der einzelnen Granula ist so groß, daß die Plättchen in der Lage sind, in den Organellen, die nach Stimulation verblieben sind, das freigesetzte Serotonin wiederaufzunehmen. Dies setzt voraus, daß die Degranulation nicht vollständig war. Diese Annahme wird durch verschiedene Untersuchungen - unter anderem auch durch die unten diskutierten Experimente - bestätigt, die zeigten, daß die maximale Serotoninfreisetzung durch Thrombinstimulation nur 70-80% beträgt.

2. Die Plättchen besitzen noch einen extragranulären Speicherpool für Serotonin. Hierfür kämen das Zytoplasma und die Membranen in Betracht.

Mit den vorliegenden Experimenten läßt sich nicht endgültig entscheiden, welches die richtige Erklärung ist.

Die Ergebnisse zeigen, daß durch die Thrombin-Plasmin-Einwirkung der Serotonintransport offenbar nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Dies ist ein Hinweis, daß Thrombin nicht zu einer generellen Schädigung des Thrombozyten führt.

Thrombozyten von Patienten mit Albinismus und/oder

storage pool disease wiesen eine deutlich herabgesetzte Speicherfähigkeit für Serotonin auf (1, 42, 104, 142). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Experimente muß man annehmen, daß diesen Erkrankungen ein komplexer Defekt zugrunde liegen muß und nicht einfach eine Verminderung der Speichergranulainhaltsstoffe.

5.2.2 Kalziumgehalt der Thrombozyten

Der Kalziumgehalt der gewaschenen, unstimulierten Plättchen liegt bei 8,5 ± 0,8 µg Kalzium/10^9 Plättchen oder 213 ± 20 nmol. Dieser Betrag stimmt mit anderen Befunden von Humanthrombozyten überein (14, 72, 78, 131, 140). Andere Autoren fanden dagegen deutlich niedrigere Werte (2, 48, 83). Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Verfahren der Plättchengewinnung bedingt.

Der größte Anteil des Kations ist in den "dense bodies" gespeichert (4, 15, 16, 24, 45, 48, 79, 132, 134). Die Aufgabe dieses Speicherkalziums liegt wahrscheinlich in der Bildung hochmolekularer, osmotisch unwirksamer, da nicht gelöster Komplexe mit Adeninnukleotiden und Serotonin. Durch diese Komplexbildung läßt sich erst die große Speicherkapazität der Organellen erklären (19, 72, 116, 117). Weitere Organellen der Plättchen, die ebenfalls Kalzium anreichern, aber nicht nach außen freisetzen können, sind das "dense tubular system" und die Mitochondrien (126, 128, 129, 145). Ob auch die α-Granula Kalzium enthalten, wie einige Befunde zeigten (9, 134), ist noch fraglich.

Der Gesamtgehalt an Kalzium der Thrombin-Plasmin-stimulierten Plättchen lag mit 3,5 ± 0,7 µg Kalzium/10^9 Plättchen deutlich unter den Werten der nichtstimulierten Thrombozyten. Das bedeutet, daß durch die Degranulation etwa 60% des Kations aus den Zellen ausgestoßen

wird. Das stimmt mit anderen Befunden überein, daß während der Freisetzungsreaktion der größte Teil des Plättchenkalziums ausgeschüttet wird (87, 88, 148). Nach Angaben von MÜRER wird während der zweiten Phase der Aggregation bis zu 88% des gesamten Kalziums freigesetzt (87, 88). Dies wäre ein Hinweis dafür, daß in den vorliegenden Experimenten die Degranulation nicht vollständig war. Das läßt den Schluß zu, daß die verwendete Thrombinkonzentration (1 U/ml) ein submaximaler Reiz für die Freisetzung ist. Nach SNEDDON nimmt das Ausmaß der Freisetzungsreaktion mit der Reizstärke zu (133). Diese graduelle Ausschüttung - die in den vorliegenden Experimenten auch an Hand der Serotoninsekretion zu beobachten war - ist wahrscheinlich durch einen entsprechend unterschiedlich großen Verlust an "dense bodies" bedingt. Denn sie sind als spezielle Speichergranula die Quelle des sezernierten Kalziums. Der in den Plättchen nach Stimulation verbleibende Anteil dieses Kations dürfte zum Teil auch in den extragranulären Kompartimenten und in den Membranen lokalisiert sein, wie zum Beispiel in den Mitochondrien und im "dense tubular system". Auch andere Versuche haben gezeigt, daß die Kalziumfreisetzung aus Membranbläschen nur unvollständig war (55). Dies könnte bedingt sein durch Kalzium-bindende Proteine, analog den Proteinen an der inneren Oberfläche des sarkoplasmatischen Rektikulums der Muskelzelle (144).

5.3 Funktionsstudien

Nach Degranulation und nachfolgendem Waschen der Plättchen war in allen Experimenten eine erhöhte extrazelluläre Radioaktivität im Suspensionsmedium der stimulierten Thrombozyten nachweisbar. Dies mag einmal ein Hinweis auf eine geringere mechanische Resistenz degranulierter Plättchen sein, so daß ein größerer Prozentsatz von ihnen durch die Beanspruchung beim Zentrifugieren

und Aufschwemmen zerstört wurde. Wahrscheinlicher ist allerdings, daß die Suspensionsflüssigkeit, die nach Aktivierung das markierte Serotonin enthielt, durch den letzten Waschvorgang nicht vollständig eliminiert werden konnte.

An der Höhe des Gesamtserotoningehaltes der letzten Suspension - er liegt erwartungsgemäß analog der verringerten Zellzahl bei durchschnittlich 64% der Ausgangsmenge - läßt sich erkennen, daß weder die Thrombin-degranulierten noch die unstimulierten Plättchen durch den letzten Waschvorgang aktiviert worden sind.

5.3.1 Thrombinstimulation

Die gewaschenen, unstimulierten Thrombozyten setzen nach Zugabe steigender Thrombinkonzentrationen zunehmende Mengen von Serotonin frei. Auch durch Stimulation mit sehr hohen Thrombinkonzentrationen (5 U/ml) gelingt es nicht, eine vollständige Serotoninausschüttung zu erreichen. Im Durchschnitt verbleiben nach maximaler Stimulation 15% des radioaktiv markierten Amins in der Zelle. Dies steht im Gegensatz zum Verhalten von Kaninchenplättchen, die eine nahezu komplette Entspeicherung zeigten (124). Dieses unterschiedliche Verhalten macht deutlich, daß Thrombin als potentestes Stimulans der Thrombozyten beim Humanplättchen entweder keine komplette Degranulation auslösen kann, oder daß die menschlichen Zellen einen beträchtlichen extragranulären Aminpool besitzen, der durch Aktivierung nicht erreicht wird. Bei dieser Differenz muß man allerdings berücksichtigen, daß es sich um prozentuale Angaben handelt. Durch den beträchtlichen Unterschied des wahren quantitativen Serotoningehaltes der beiden Plättchenspezies wird der nach Stimulation in der Zelle verbleibende Betrag nicht im gleichen Maße voneinander abweichen.

Die degranulierten Plättchen zeigten nach erneutem Kontakt mit Thrombin keine Veränderungen. Es kommt weder zur Formänderung noch zur Freisetzung. Dies bedeutet, daß durch die vorausgegangene Stimulierung der Zellen mit einer hohen Thrombinkonzentration (1 U/ml) der Rezeptor an der Oberfläche der Plasmamembran entweder zerstört wurde oder durch Thrombin (Plasmin ?) auf Dauer blockiert worden ist. Über die Natur des Rezeptors und den Mechanismus der Thrombinwirkung gibt es noch keine endgültige Klarheit.

Diskutiert werden verschiedene spezifische Membranproteine (112, 113) - besonders Glykoproteine (53, 114) - wie zum Beispiel das Glykokalicin, einer Komponente des Gylkoprotein I-Komplexes, das nach Interaktion mit Thrombin in die Suspensionsflüssigkeit abgegeben werden soll (36, 61, 101). Andere Berichte machen dagegen die Abspaltung dieses Moleküls durch Thrombin unwahrscheinlich (33, 111, 118).

In neueren Untersuchungen ist es gelungen, ein proteolytisches Substrat für α-Thrombin auf der Oberfläche der Plasmamembran des Plättchens zu isolieren - das Glykoprotein V (84, 111) mit einem Molekulargewicht von 90.000 Dalton. Nach Thrombinbehandlung (1 U/ml) ist es aus der Membran verschwunden. Dafür erscheint im Überstand ein hydrolysiertes Fragment mit einem Molekulargewicht von 70.000 Dalton.

Die proteolytische Wirkung des Thrombin scheint die wesentliche Grundlage für seine Wirkung zu sein (5, 73, 114). Die Thrombinbindung an der Membran ist ein komplexer Vorgang. Interessanterweise ist die Affinität der Membran gleich groß bei aktivem und bei inaktiviertem Thrombin (137), obwohl letzteres nicht zur Plättchenstimulierung führt (22). Dies zeigt, daß die einfache Bindung des Enzyms nicht ausreicht, um die Plätt-

chen zu aktivieren (110). Es erscheint daher durchaus möglich, daß an der Vermittlung der Thrombinwirkung mehrere Membranproteine beteiligt sind (100).

Neuere Arbeiten haben darüber hinaus gezeigt, daß die Thrombinbindung an Zellen von der Zellform abhängig ist, indem der Grad der Zellrundung ein Faktor ist, der die Fähigkeit der Thrombinbindung begrenzt (30, 32, 35, 37). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Plättchenaktivierung durch Thrombin zu einer Abnahme der Beweglichkeit der Membranlipide und -proteine führt (96, 97).

5.3.2 Kollagenstimulation

Die Zugabe steigender Kollagenkonzentrationen zu der unstimulierten Plättchensuspension führt ebenfalls zu einem zunehmenden Ausmaß der Antwort. Die freigesetzte Serotoninmenge erreicht aber nicht die Größenordnung der Thrombinaktivierung. Sie lag bei den unstimulierten Plättchen nach Zugabe einer hohen Konzentration (Endkonzentration 2 µg/ml Suspension) im Mittel bei 60%.

Die Thrombin-Plasmin-degranulierten Plättchen zeigten eine deutlich reduzierte Freisetzung von verbliebenem ^{14}C-Serotonin, die auch nach hohen Kollagendosen im Durchschnitt nur bei 30% lag. Hierfür bieten sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten an:

Ein wichtiger Freisetzungsmechanismus steht im Zusammenhang mit dem Adeninnukleotidgehalt der Plättchen. Normalerweise fördert freigesetztes ADP die Kollagen-induzierte Sekretion. Da der ADP-Gehalt der degranulierten Thrombozyten deutlich vermindert ist, muß die Wirksamkeit dieses Feedback-Mechanismus verringert sein (44, 94).

Daneben könnte die Plasmamembran nach der Einwirkung von

Thrombin bzw. Plasmin und dem nachfolgenden engen Zellkontakt während der Aggregation derart verändert sein, daß die Kollagenwirksamkeit verringert ist (44).

Schließlich ist die Kollagen-induzierte Aggregation abhängig von der Thromboxan A_2-Synthese. Es scheint nun so, daß Thrombin-degranulierte Plättchen nicht im gleichen Ausmaß diese Substanz bilden können wie unbehandelte Kontrollthrombozyten.

5.3.3 ADP-Stimulation

Geringe ADP-Konzentrationen (10^{-6} Mol/l) führten bei degranulierten wie auch bei unstimulierten Kontrollplättchen nur zur primären Phase der Aggregation ohne nachfolgende Freisetzungsreaktion. Für die anschließende Desaggregation der Plättchen ist ein kalziumhaltiges Medium notwendig (68, 69, 93, 127).

Höhere ADP-Konzentrationen (10^{-5} Mol/l) führte bei den degranulierten Thrombozyten zu einem unterschiedlichen Verhalten. Während es in den meisten Experimenten - ähnlich wie bei den Kontrollplättchen - nicht zu einer nennenswerten Freisetzung von Serotonin und zur reversiblen Aggregation kam - wobei die Desaggregation allerdings verzögert eintrat -, zeigten die Zellen in drei Versuchen ein abweichendes Verhalten. In diesen Fällen kam es augenscheinlich zur sekundären Phase der Plättchenaggregation mit Freisetzung und irreversibler Aggregation. Dabei kam es zu einem Verlust von durchschnittlich 27% Serotonin. Dieses Verhalten gibt einen Hinweis darauf, daß sich die Zellen nach der Thrombin/Plasmin-Stimulation noch nicht völlig erholt hatten. Es ist bekannt, daß Thrombozyten, die sich nicht im Ruhezustand befinden,durch ADP zur sekundären Phase der Aggregation angeregt werden können. Außerdem hat sich gezeigt, daß Plättchen nach ADP-Kontakt Freisetzung und irreversible

Aggregation eingehen, falls Spuren von Thrombin im Suspensionsmedium sind (50, 93). Bei den vorliegenden Experimenten ist es durchaus denkbar, daß das für die Degranulation zugefügte Thrombin durch den nachfolgenden Waschvorgang nicht immer vollständig entfernt werden konnte.

5.4 Kalziumtransport durch die Membran

Es hat sich gezeigt, daß eine Wirkung des Thrombin in der Zunahme der Membranpermeabilität für Kalzium besteht. So kommt es gleichzeitig mit der Freisetzungsreaktion zur Aufnahme von extrazellulärem Kalzium (62, 76, 88, 125). Im Gegensatz zu anderen sekretorisch aktiven Zellen ist aber dieser Kalziumeinstrom nicht notwendig für die Plättchenaktivierung durch Kollagen, ADP und Thrombin (9, 34). Da die Thrombin-induzierte Aktivierung der Thrombozyten mit begleitender Aggregation und Freisetzungsreaktion offenbar reversibel ist, die Plättchenmembran ihre Integrität beibehalten und den funktionellen Ruhezustand wiedererlangen, muß man erwarten, daß die Permeabilitätserhöhung nur kurze Zeit befristet ist. Wie gezeigt werden konnte, besitzt die Membran unstimulierter Plättchen nur eine geringe Permeabilität für dieses Kation (140). Würde nach Aktivierung der Zelle bei anhaltend erhöhter Permeabilität die zytoplasmatische Kalziumkonzentration nicht wieder ihre Ausgangskonzentration erreichen, so wäre es zum Beispiel unerklärlich, wie sich das mikrotubuläre System in den Plättchen neu organisieren könnte, da Kalzium die Mikrotubuli depolymerisiert (6).

In den vorliegenden Experimenten wurde die ^{45}Ca-Aufnahme von Thrombin/Plasmin-degranulierten und nicht stimulierten Plättchen gemessen, um die Permeabilitätsverhältnisse etwa eine Stunde nach Stimulation zu vergleichen. Wie die Ergebnisse zeigen, ist die aufgenommene

Kalziummenge zu jedem gemessenen Zeitpunkt in beiden Gruppen gleich groß. Dies steht im Einklang mit den morphologischen und funktionellen Befunden, die erkennen ließen, daß sich die stimulierten Plättchen wieder im Ruhezustand befanden.

Aus methodischen Gründen ist die Streubreite der gemessenen Werte recht groß. Doch da sie alle in der gleichen Größenordnung liegen, geben die Experimente zumindest einen deutlichen Hinweis, daß die Membranpermeabilität der degranulierten Plättchen nicht höher liegt als bei den unstimulierten Thrombozyten.

MASSINI et al. fanden dagegen eine etwa um den Faktor 3 erhöhte Kalziumpermeabilität von Thrombin-degranulierten Thrombozyten über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde. Nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten mit markiertem Kalzium lag die von ihnen gemessene Aufnahme bei etwa 500 nmol Kalzium/10^{11} Plättchen bei den stimulierten und etwa 160 nmol Kalzium/10^{11} Plättchen bei den Kontrollthrombozyten (135). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen dagegen, daß die stimulierten Plättchen nach zwei Minuten 34 nmol Kalzium/10^{11} Plättchen aufgenommen hatten und die unstimulierten 25 nmol Kalzium/10^{11} Plättchen. Die scheinbar leicht erhöhte Aufnahme der degranulierten Thrombozyten ist methodisch bedingt, da nach vier- bzw. sechsminütiger Aufnahmezeit dieser Unterschied nicht mehr zu bemerken war.

Die hier gefundenen Ergebnisse der gleichen Membranpermeabilität für Kalzium bei stimulierten und unstimulierten Plättchen läßt sich gut mit den morphologischen und funktionellen Befunden in Übereinstimmung bringen. Die gemessene Aufnahme von Kalzium könnte hierbei Ausdruck eines Austausches mit intrazellulärem Kalzium sein. Einen derartigen Austausch haben Studien In vivo (99) und In vitro (135) gezeigt. Bei physiologischer

Kalziumkonzentration lag er in einem Beobachtungszeitraum von 120 min bei etwa 5%. Dies konnte allerdings in anderen Berichten nicht bestätigt werden (88, 140).

Da degranulierte Plättchen ihren Ruhezustand wiedererlangen können (112), muß als einer der ersten Schritte der Erholung die Kalziumpermeabilität der Plasmamembran auf den Ruhezustand zurückfallen. Im ruhenden Plättchen muß die Kalziumkonzentration sehr niedrig sein - etwa 10^{-8} Mol/l -, da das kontraktile Aktomyosin entspannt ist (76). COHEN und DE VRIES berichten, daß eine kontraktile Aktivität bei Kalziumkonzentrationen von 10^{-6} Mol/l oder höher zu beobachten ist (12). Die Existenz von Mikrotubuli im ruhenden Plättchen deutet ebenfalls auf eine niedrige Kalziumkonzentration im Zytosol hin, da diese Strukturen durch Kalzium depolymerisiert werden (6, 76, 146).

5.5 Vergleichende Betrachtung mit Befunden von Kaninchenplättchen

Die morphologischen Aspekte degranulierter Thrombozyten und Kontrollplättchen von Menschen und Kaninchen gleichen einander. Allerdings ist in den unstimulierten Kaninchenplättchen der Gehalt an "dense bodies" höher als bei menschlichen Plättchen. Es zeigte sich, daß die Zahl der osmophilen Granula parallel geht mit dem Serotoningehalt der Zelle (139). In beiden Fällen haben die Plättchen eine diskoide Form und eine intakte Plasmamembran. Thrombin führt nicht zur Verschmelzung der Plättchenmembran, wie schon Befunde von KUHNKE und PARMEGGIANI ergeben haben (59, 106). Der Organellengehalt der stimulierten Plättchen ist bei beiden Spezies deutlich vermindert. Die Zahl und Größe von Vakuolen erscheint dagegen bei beiden vermehrt.

Die Reakkumulationsfähigkeit für Serotonin war bei den

Kaninchenplättchen 30-60 Minuten nach Thrombinstimulation gering, unabhängig von der Thrombinkonzentration (121, 124). In diesen Plättchen wurde eine verminderte Speicherkapazität nach Thrombin-Degranulation gefunden. In differenzierten Studien konnte gezeigt werden, daß der zytoplasmatische Pool sich nicht von dem der unstimulierten Plättchen unterschied, der Speichergranulapool war dagegen deutlich erniedrigt. Eine Schädigung des Serotoninaufnahmemechanismus konnte nicht festgestellt werden (124).

Die Versuche mit Humanthrombozyten haben dagegen gezeigt, daß die Zellen nach Degranulation in der Lage sind, die gesamte freigesetzte Serotoninmenge anschließend wiederaufzunehmen. Entweder besitzen menschliche Thrombozyten einen sehr viel größeren extragranulären Speicherpool, oder die Substanz gelangt in die nach Degranulation noch in der Zelle verbliebenen "dense bodies" zurück.

Für die letzte Annahme spricht, daß es - im Gegensatz zu Kaninchenplättchen - offenbar nicht möglich ist, die Thrombozyten auch mit großen Thrombinkonzentrationen völlig zu entspeichern, und daß die einzelnen "dense bodies" im Vergleich zu Kaninchenplättchen sehr viel geringere Serotoninmengen beinhalten und damit eine größere Aufnahmefähigkeit besitzen.

Die Experimente mit Humanplättchen haben gezeigt, daß nach Stimulation mit Thrombin der größte Teil des gespeicherten Kalziums freigesetzt wird. Elektronenmikroskopisch konnte nachgewiesen werden, daß sich dieses Kation in großen Mengen in den "dense bodies" und zum kleinen Teil in den α-Granula befindet. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden von MÜRER und HOLME sowie von SKAER (88, 132). Im Gegensatz hierzu scheint das wichtigste divalente Kation in den Speichergranula der

Kaninchen das Magnesium zu sein (4, 124). Es konnte gezeigt werden, daß der Magnesiumgehalt nach wiederholter Stimulation der Plättchen mit niedrigen Thrombinkonzentrationen (0,05 U/ml) von 12 µmol/10^{11} Plättchen auf etwa 6 µmol/10^{11} Plättchen abgesunken war (114). Dies entspricht einer Reduktion um etwa 50%. Im Vergleich zur Abnahme des Kalziumgehaltes mit hohen Thrombinkonzentrationen (1 U/ml) bei Humanthrombozyten ist der Verlust von Kationen bei Kaninchenplättchen etwas geringer. Der Kalziumgehalt der unstimulierten Kaninchenplättchen liegt mit 6 µmol/10^{11} Plättchen deutlich unter den Werten, die bei menschlichen Thrombozyten gefunden wurden.

Es ist bis heute nicht bekannt, welche Bedeutung diesem unterschiedlichen Kationenverhältnis zukommt. Die Aufgabe der zweiwertigen Kationen scheint in beiden Fällen gleich zu sein. Sie dienen der Bildung von Komplexen mit Adeninnukleotiden und mit Serotonin in den Speichergranula (116, 117).

Kaninchenplättchen, die mit hohen Thrombinkonzentrationen (0,5 U/ml) stimuliert wurden, setzten 92,4 $\pm$ 2,6 Prozent ihres radioaktiv markierten Serotonins wieder frei. Bei menschlichen Plättchen war eine vergleichbare komplette Sekretion selbst nach sehr hohen Thrombinkonzentrationen (5 U/ml) nicht möglich. Im Durchschnitt wurden von ihnen nur 84 Prozent des Amins freigesetzt. Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten ist nicht bekannt. Möglich wäre - wie schon oben angedeutet -, daß beim menschlichen Thrombozyten ungeachtet der Stärke des Sekretionsreizes keine vollständige Degranulation zu erreichen ist, oder der extragranuläre Speicherpool beim menschlichen Thrombozyten größer ist als beim Kaninchenplättchen.

Nach Vorbehandlung mit einer hohen Thrombinkonzentra-

tion konnte nach erneutem Thrombinkontakt weder beim menschlichen Plättchen noch beim Kaninchenthrombozyten eine Aggregation ausgelöst werden, und es erfolgt auch keine weitere Freisetzung von Granulainhalt (124). Die Zellen beider Spezies verhielten sich dem erneuten Reiz gegenüber völlig refraktär.

In Gegenwart von Fibrinogen konnten Thrombin-degranulierte Kaninchenplättchen durch Kollagen zur Aggregation und Freisetzung angeregt werden. Das Ausmaß der Aggregation war jedoch immer geringer als bei den Kontrollplättchen. Wie bei den Humanplättchen scheint auch bei Kaninchenthrombozyten der reduzierte ADP-Gehalt für das verminderte Ansprechen verantwortlich zu sein, da diese Substanz einen fördernden Einfluß auf die Kollagen-induzierte Freisetzung besitzt (44, 94). Die Untersuchungen am Kaninchenplättchen legen nahe, daß die Freisetzung neben ADP noch durch andere Mechanismen gefördert werden muß, so beispielsweise auch durch die Synthese von Thromboxan A_2 (57, 103, 124).

Diese Befunde legen den Schluß nahe, daß die Rezeptoren für Kollagen und Thrombin an der Plättchenoberfläche verschiedener Natur sein müssen, da nach initialer Thrombinbehandlung die Empfindlichkeit gegenüber Kollagen noch erhalten war, während eine erneute Thrombinstimulation völlig wirkungslos blieb.

Auf Zugabe mikromolekularer ADP-Konzentrationen aggregierten die Thrombin-degranulierten Kaninchenplättchen wie auch die Kontrollthrombozyten. Allerdings war das Ausmaß der Reaktionen unterschiedlich. Die degranulierten Plättchen aggregierten in der Regel stärker auf die Zugabe von ADP als unstimulierte Zellen. Die Desaggregation war deutlich verzögert (120, 121, 124). Das gleiche Verhalten, nämlich eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ADP nach Thrombindegranulation, zeigten auch die menschlichen Plättchen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die hier durchgeführten Untersuchungen haben folgende neue Befunde ergeben:

1. Morphologisch unterscheiden sich Thrombin- und Plasmin-degranulierte Humanthrombozyten von unstimulierten Plättchen in ihrem geringeren Gehalt an Speichergranula sowie einer Vermehrung der Vakuolen. Die alcianblaubindenden Stellen der Glykokalix, die vielleicht die Thrombinrezeptoren (Plasminrezeptoren ?) oder die Stellen der späteren Fibrinogenbindung darstellen, scheinen zu fehlen. Thrombin- und Plasmin-degranulierte Thrombozyten haben ihre diskoide Gestalt wiedergewonnen, mikrotubuläres und "dense tubular system" sind erhalten.

2. Die Funktionsstudien zeigen, daß Thrombin- und Plasmin-degranulierte Humanplättchen in Gegenwart von Kollagen und ADP erneut aggregieren können. Gegenüber einer weiteren Thrombinstimulierung sind sie völlig refraktär.

3. Während einer Thrombin-Plasmin-Stimulation sezernieren Humanthrombozyten den größten Teil ihres Granula-gebundenen Kalziums und Serotonins.

4. Thrombin- und Plasmin-behandelte Plättchen sind in der Lage, freigesetztes Serotonin wieder aufzunehmen.

5. Aufnahme und/oder Austausch von Kalzium liegt bei aktivierten Humanplättchen in der gleichen Größenordnung wie bei unstimulierten Zellen. Dies bedeutet, daß die Permeabilität der Plasmamembran für Kalzium nach Kontakt mit Thrombin und Plasmin wieder zu dem Ausgangswert zurückkehrt. Diese Beobachtungen sind vereinbar mit in vivo Befunden, die zeigen, daß ak-

vierte Thrombozyten unter Wahrung ihrer Integrität im Kreislauf verbleiben können. Andererseits werden durch unsere eigenen Untersuchungen an funktionell noch weitgehend intakten Thrombozyten die Befunde von MASSINI et al. (77) widerlegt, die mit Thrombinstimulation eine erhöhte Kalziumdurchlässigkeit der Plättchenplasmamembran fanden.

6. Ein Vergleich der hier erhobenen Befunde an Humanthrombozyten mit den Ergebnissen von Thrombin-degranulierten Kaninchenplättchen ergibt weitgehende Übereinstimmung. Allerdings konnte eine Serotoninentspeicherung selbst mit sehr hohen Thrombinkonzentrationen bei Humanplättchen nicht im gleichen Ausmaß wie bei Kaninchenthrombozyten erreicht werden. Dagegen war die Reakkumulation von Serotonin nach Thrombin-Degranulation beim Kaninchenplättchen sehr viel geringer. Ein weiterer Unterschied, dessen Bedeutung ungeklärt ist, besteht in der Zusammensetzung der zweiwertigen, Granula-gebundenen Kationen. Während beim Kaninchenplättchen der Kalziumgehalt relativ gering ist und Magnesium das Hauptkation in den Speichergranula darstellt, entfällt beim menschlichen Thrombozyten der größte Anteil auf das Kalzium.

7. Die vorliegenden Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß auch beim Menschen unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen Thrombozyten mit einem erworbenen Speichergranula- und Aggregationsdefekt zirkulieren können. Dies könnte für Hämostasedefekte bei normaler Thrombozytenzahl von klinischer Bedeutung sein.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEN, D.J., and REIMERS, H.-J. (1978)
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin 84, 187
Storage pool disease: Untersuchungen zum Defekt der Serotonin-Speicherfähigkeit.

2. BAKER, R.J., McNEIL, J.J., and LANDER, H. (1978)
Thrombos. Haemostas. 39, 360
Platelet metal levels in normal subjects determined by atomic absorbtion spectrometry.

3. BEHNKE, O. (1968)
J. Ultrastruct. Res. 24, 51
Electronmicrocsopical observations on the surface coating of human blood platelets.

4. BERNEIS, K.H., PLETSCHER, A., and DA PRADA, M. (1969)
Nature (Lond.) 224, 281
Metal-dependent aggregation of biogenic amines: a hypothesis for their storage and release.

5. BERNDT, M.C., and PHILLIPS, D.R. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 59
Purification and preliminary physicochemical characterization of human platelet membrane glycoprotein V.

6. BORISY, G.G., OLMSTEAD, J.B., MARCEUM, J., and ALLEN, C. (1974)
Fed. Proc. 33, 167
Microtubule assembly in vitro.

7. BORN, G.V.R., and GILLSON, R.E. (1959)
J. Physiol. (Lond.) 146, 472
Studies on the uptake of 5-hydroxytryptamnine in blood platelets.

8. BOTTECCHIA, D., and FANTIN, G. (1973)
Thromb. Diath. Haemorrh. 30, 567
Platelets and clot retraction. Effect of divalent cations and several drugs.

9. CARAFOLI, E., CLEMENTI, F., DRABIKOWSKI, W., and MARGRETH, A. (1975)
North Holland Publications, Co., Amsterdam.
Calcium transport in contraction and secretion.

10. CASTALDI, P.A., LARRIEU, M.J., and CAEN, J. (1965)
Nature (Lond.) 207, 422
Availibility of platelet factor 3 and activation of factor XII in thrombasthenia.

11. COHEN, J., BOHAK, J., DE VRIES, A., and KATCHALSKI, E. (1969)
Europ. J. Biochem. 10, 388
Thrombosthenin M. Purufication and interaction with thrombin.

12. COHEN, J., and DE VRIES, A. (1973)
Nature (Lond.) 246, 32
Platelet contractile regulation in an isometric system.

13. COOPER, H.A., MASON, R.G., and BRINKHOUSE, K.M. (1976)
Ann. Rev. Physiol. 38, 501
The platelet membrane and surface reactions.

14. COUSIN, C., and CAEN, J. (1964)
Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. 9, 520
Dosage du magnesium et du calcium dans les plaquettes sanguines humaines.

15. COSTA, J.L., MURPHY, D.L., and TANAKA, Y. (1974)
Fed. Proc. 33, 294
Storage of calcium in human platelets: estimation of storage-packet size.

16. COSTA, J.L., REESE, T.S., and MURPHY, D.L. (1974)
Science 183, 537
Serotonin storage in platelets: estimation of storage-packet size.

17. CZERNOBILSKY, H., and ALEXANDER, B. (1961)
Little, Brown & Co., Boston, Mass. p. 565
In: Blood Platelets S.A. Johnson, R.W. Monto, J.W. Rebuck, and R.C. Horn, Jr. (eds.)
Some qualitative and quantitative aspects of platelet function in normal, thrombocytopenic and thrombocytopathic states.

18. DA PRADA, M., PLETSCHER, A., and TRANZER, J.R. (1971)
J. Physiol. (Lond.) 217, 679
Storage of ATP and 5-hydroxytryptamine in blood platelets of guinea pigs.

19. DA PRADA, M., PLETSCHER, A., and BERNEIS, K.H., (1971)
In: Platelet aggregation, Caen, J. (ed.)
Masson & Cie, Paris, p. 173
Storage of nucleotides in blood platelets.

20. DA PRADA, M., BURKHARD, W.P., and PLETSCHER, A. (1972)
Experientia 28, 845
Cyclic AMP of blood platelets: accumulation in organelles storing 5-hydroxytryptamine and ATP.

21. DAVEY, M.G., and LÜSCHER, E.F. (1965)
Nature (Lond.) 207, 730
Action of some coagulant snake venoms upon blood platelets.

22. DAVEY, M.G., and LÜSCHER, E.F. (1967)
Nature 216, 857
Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets.

23. DAVEY, M.G., and LÜSCHER, E.F. (1968)
Biochem. Biophys. Acta 165, 490
Release reactions of human platelets induced by thrombin and other agents.

24. DAY, H.J., and HOLMSEN, H. (1971)
Ser. Haematol. 4, 3
Concepts of the platelet release reaction.

25. DETWILLER, T.C., and FEINMAN, R.D. (1973)
Biochemistry 12, 2462
Kinetics of thrombin-induced release of adenosine triphosphate by platelets. Comparison with release of calcium.

26. DOERY, J.C.G., HIRSH, J. (1973)
Br. J. Haematol. 25, 657
Energy metabolism in washed human platelet responsive to ADP: Comparison with platelets in plasma.

27. DROLLER, M.J., and FOX, M.C. (1973)
Scand. J. Haematol. 11, 35
Zitiert nach:
Hagen,I. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 392, 242
Effects of thrombin on washed, human platelets: changes in the subcellular fractions.

28. FEINMAN, R.D. , and DETWILLER, T.C. (1974)
Nature 249, 172
Platelet secretion induced by divalent cation ionophores.

29. FEINSTEIN, M.B., and FRASER, C. (1975)
J. Gen. Physiol. 66, 561
Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. Inhibition by PGE_1 and dibutyryl cyclic AMP.

30. FOLKMAN, J., and MOSCONA, A. (1978)
Nature (Lond.) 273, 345
Role of cell shape in growth control.

31. GANGULY, P. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 4286
Isolation and properties of a thrombin sensitive protein from human blood platelets.

32. GOSPODAROWICZ, D., VLODAVASKY, I., GREENBERG, G., and JOHNSON, L.K. (1979)
In: Hormones and cell culture
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 6, 561
Cellular shape is determined by the extracellular matrix and is responsible for the control of cellular growth and function.

33. GREENBERG, J.P., CAZENAVE, J.-P., PACKHAM, M.A., KINGLOUGH-RATHBONE, R.L., and MUSTARD, J.F. (1979), Blood 53, 916
Effect of pretreatment of rabbit platelets with proteolytic enzymes or neuramidase on their adherence to a collagen coated surface or the subendothelium of the rabbit aorta.

34. GRETTE, K. (1962)
Acta Physiol. Scand. Suppl. 56, 195
The mechanism of thrombin-catalysed haemostatic reactions in blood platelets.

35. GUINIVAN, P., LADDA, R.L. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3377
Decrease in epidermal growth factor receptor levels and production of material enhancing epidermal growth factor binding accompany the temperature-dependent changes from normal to transformed phenotype.

36. HAGEN, I., SOLUM, N.O., and OLSEN, T. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 468,1
Membrane alterations in connection with the release reaction in human platelets as studied by the lactoperoxidase iodination technique and by agglutination with bovine factor VIII-related protein.

37. HALL, W.M., and GANGULY, P. (1980)
J. Cell Biol. 87, 601
Binding of thrombin to cultured human fibroblasts: Evidence for receptor modulation.

38. HARBURY, C.B., HERSHGOLD, J.E., and SCHRIER, S.L. (1972)
Thromb. Diath. Haemorrh. 28, 2
Requirement for aggregation on washed human platelets suspended in buffered salt solution.

39. HARBURY, C.B., and SCHRIER, S.L. (1974)
J. Lab. Clin. Med. 83, 877
The effect of partial release reaction on subsequent platelet function.

40. HARBURY, C.B. (1976)
Clin. Res. 24, 310
Evidence for pre-release in circulating platelets.

41. HARDISTY, R.M., HUTTON, R.A. (1966)
Br. J. Haematol. 12, 764
Platelet aggregation and the availiability of platelet factor 3.

42. HARDISTY, R.M., and MILLS, D.C.B. (1972)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 201, 429
The platelet defect associated with albinism.

43. HASLAM, R.J. (1964)
Nature 202, 765
Role of adenosine diphosphate in the aggregation of human blood platelets by thrombin and fatty acids.

44. HASLAM, R.J. (1967)
In: Physiology of Haemostasis and Thrombosis, Johnson, S.A., and Seegers, W.H. (eds.), Chaeles C. Thomas, Springfield, III. p. 88
Mechanism of blood platelet aggregation.

45. HERMAN, L., SATO, T., and HALES, C.N. (1973)
J. Ultrastruc. Res. 42, 298
The electron microscopic localization of cations to pancreatic islets of Langerhans and their possible role in insulin secretion.

46. HOLME, R., SIXMA, J.J., MÜRER, E.H., and HOVIG, T. (1973).
Thromb. Res. 3, 347
Demonstration of platelet fibrinogen secretion via their surface connection system.

47. HOLMSEN, H., DAY, H.J., and STORM, E. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 186, 254
Adeninnucleotide metabolism of blood platelets. VI. Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction.

48. HOLMSEN, H., DAY, H.J. (1971)
Ser. Haematol. 4, 28
Adenine nucleotides and platelet function.

49. HOLMSEN, H. (1975)
In: Biochemistry and Pharmacology of platelets. K. Elliot, J. Knight (eds.)
Ciba Foundation Symposium 35 (new series)
Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam, Oxford, New York, p. 175
Biochemistry of platelet release reaction.

50. HUZOOR-AKBAR, and ARDLIE, N.G. (1978)
Br. J. Haematol. 38, 381
Further evidence for the role of thrombin in the platelet release reaction caused by various agents, and the nature of biphasic platelet aggregation.

51. JAMES, H.M., FREIDA, L.C., and GEORGE, J.R. (1974)
J. Cell. Biol. 60, 775
Calcium-containing platelet granules.

52. JAMIESON, G.A. (1974)
In: Platelets. M.G. Baldini, and S. Ebbe (eds.) Grune and Stratton Inc., New York-San Francisco-London, p. 171
Interaction of platelets and collagen.

53. JENKINS, C.S.P., ALI-BRIGGS, E.F., ZONNEVELD, G.T.E., STURK, A., and CLEMETSON, K.J. (1980)
Thromb. Haemostas. 42, 1490
Human blood platelet membrane glycoproteins. Resolution in different polyacrylamide gel electrophoretic systems.

54. KARPATKIN, S., and LANGER, R.M. (1968)
J. Clin. Invest. 47, 2158
Biochemical energetics of stimulated platelet plug formation. Effect of thrombin, adenosine diphosphate, and epinephrine nucleotide kinetics.

55. KÄSER-GLANZMANN, R., JAKABOVA, M., GEORGE, J.N., and LÜSCHER, E.F. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 466, 429
Stimulation of calcium uptake in platelet membrane vesicles by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and protein kinase.

56. KINGLOUGH-RATHBONE, R.L., CHAHIL, A., PACKHAM, M.A., REIMERS, H.-J., and MUSTARD, J.F. (1975)
Thromb. Res. 7, 435
Effect of ionophores A 23, 187 on thrombin degranulated washed rabbit platelets.

57. KINGLOUGH-RATHBONE, R.L., PACKHAM, M.A., REIMERS, H.-J., CAZENAVE, J.-P., and MUSTARD, J.F. (1977)
J. Lab. Clin. Med. 90, 707
Mechanism of platelet shape change, aggregation and release induced by collagen, thrombin or A 23, 187.

58. KISSELBACH, T.H., and WAGNER, R.H. (1966)
Amer. J. Physiol. 211, 1472
Fibrin stabilizing factor: A thrombin labile platelet protein.

59. KUHNKE, E. (1958)
Pflügers Archiv 268, 87
Elektronenmikrospopische Untersuchungen über die Veränderungen der Thrombozyten und des Fibringerinnsels im Laufe der Gerinnung unter besonderer Berücksichtigung der Retraktion.

60. KURAMOTO, A., STEINER, M., and BALDINI, M. (1969)
Blood, 34, 522
Stimulation of platelet glycolysis.

61. LAWLER, J.W., CHARD, F.C., and FANG, P.-H. (1977)
Thrombos. Haemostas. 37, 355
Observation of a high molecular weight platelet protein released by thrombin.

62. LE BRETON, G.C., and FEINBERG, H. (1974)
Pharmacologist 16, 313
ADP-induced changes in intraplatelet Ca^{2+} ion concentration.

63. LEWIS, N., and MAJERUS, P. (1969)
J. Clin. Invest. 48, 2114
Lipid metabolism in human platelets.

64. LINGJAERDE, Jr. (1971)
Acta Physiol. Scand. 83, 257
Uptake of serotonin in blood platelets in vitro. II: Further studies on the effect of small anions.

65. LÜSCHER, E.F. (1956)
Vox. Sang. 1, 133
Viscous metamorphosis of blood platelets and clot retraction.

66. LÜSCHER, E.F. (1967)
Thrombos. Diathes. Haemorrh. 26, 135
Fibrinogen und Thrombosthenin.

67. LÜSCHER, E.F., and MASSINI, P. (1975)
In: Biochemistry and Pharmacology of platelets. K. Elliott, J. Knight (eds.)
Ciba Foundation Symposium 35 (new series)
Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland, Amsterdam, Oxford, New York, p. 5
Common pathway of membrane reactivity after stimulation by different agents.

68. MAC MILLAN, D.C. (1976)
Nature (Lond.) 211, 40
Secondary clumping effect in human citrated platelet-rich plasma produced by adenosine diphosphate and adrenaline.

69. MAC FARLANE, D.E., WALSH, P.N., MILLS, D.C.B., HOLMSEN, H., and DAY, H.J. (1975)
Br. J. Haematol. 30, 457
The role of thrombin in ADP-included platelet aggregation and release.

70. MAJERUS, P.W., and BRODIE, G.N. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 4253
The binding of phytohemagglutinins to human platelet plasmamembranes.

71. MARCUS, A.J., ZUCKER, M.B. (1965)
Grune and Stratton Inc., New York
The physiology of blood platelets.

72. MARTIN, H.J. (1974)
J. Cell Biol. 60, 775
Calcium containing platelet granules.

73. MARTIN, B.M., FEINMAN, R.D., and DETWILLER, T.C. (1975)
Biochemistry 14, 1308
Platelet stimulation by thrombin and other proteinases.

74. MASSINI, P., and LÜSCHER, E.F. (1971)
Thromb. Diath. Haemorrh. 25, 13
The induction of the release reaction in human blood platelets by close cell contact.

75. MASSINI, P., and LÜSCHER, E.F. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 372, 109
Some effects of ionophores for divalent cations on blood platelets. Comparison with the effects of thrombin.

76. MASSINI, P., LÜSCHER, E.F. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 436, 652
On the significance of the influx of calcium ions into stimulated human blood platelets.

77. MASSINI, P., KÄSER-GLANZMANN, R., and LÜSCHER, E.F. (1978)
Thrombos. Diath. Haemorrh. 40, 212
Movement of calcium ions and their role in the activation of platelets.

78. MAUPIN, B. (1953)
Rev. Hematol. 8, 302
Acquisitions recentes sur l'histochemie et la biochemie des plaquettes sangquines de l'homme.

79. MICHAL, R., and FIRKIN, B.G. (1969)
Ann. Rev. Pharmacol 9, 95
Physiological and pharmacological aspects of the platelets.

80. MILLS, D.C.B., and ROBERTS, G.C.K. (1967)
Nature 213, 35
Membrane active drugs and the aggregation of human blood platelets.

81. MORGENSTERN, E. (1980)
Progr. in Histochem. 12, 1
Ultrahistochemistry of human blood platelets.

82. MORGENSTERN, E. (1981)
Acta histochemica, im Druck
Simultaneous staining using Alcian blue and Tannic Acid for electron microscopic differentiation of proteins in glycoproteins in blood platelets.

83. MORSE, E.E., JACKSON, D.P., and CONLEY, C.L. (1965)
J. Clin. Invest. 44, 809
Role of platelet fibrinogen in the reaction of platelets to thrombin.

84. MORITA, H., and ASAADA, T. (1956)
Acta Haematol. Jap. 19, 426
Zitiert nach:
Steiner, M., and Tateishi, T. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 367, 232
Distribution and transport of calcium in human platelets.

85. MOSHER, D.F., VAHERI, A., CHOATE, J.J., and GAHMBERG, C.G. (1979)
Blood 53, 437
Action of thrombin on surface glycoproteins of human platelets.

86. MÜRER, E., HELLEM, A.J., and ROZENBERG, M.C. (1967)
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 19, 280
Energy metabolism and platelet function.

87. MÜRER, E.H. (1969)
Science 166, 623
Thrombin induced release of calcium from blood platelets.

88. MÜRER, E.H., and HOLME, R. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 222, 197
A study of the release of calcium from human blood platelets and its inhibition by metabolic inhibitors, N-ethylmaleinide and aspirin.

89. MUSTARD, J.F., HEGARD, B., ROSWELL, H.C., and MAC MILLAN, R.L. (1964)
J. Lab. Clin. Med. 64, 548
Effect of adenosine nucleotides on platelet aggregation and clotting time.

90. MUSTARD, J.F., ROSWELL, H.C., and MURPHY, E.A. (1966)
Br. J. Haematol. 12, 1
Platelet economy (platelet survival and turnover).

91. MUSTARD, J.F., and PACKHAM, M.A. (1970)
Pharmac. Rev. 22, 97
Factors influencing platelet function: adhesion, release, and aggregation.

92. MUSTARD, J.F., PERRY, D.W., ARDLIE, N.G., and PACKHAM, M.A. (1972)
Br. J. Haematol. 22, 193
Preparation of suspensions of washed platelets from human.

93. MUSTARD, J.F., PERRY, D.W., KINGLOUGH-RATHBONE, R.L., and PACKHAM, M.A. (1975)
Am. J. Physiol. 228, 1757
Factors responsible for ADP-induced release of platelet constituents.

94. MUSTARD, J.F., KINGLOUGH-RATHBONE, R.L., REIMERS, H.-J., PERRY, D.W., and PACKHAM, M.A. (1975)
5th Congr. Int. Soc. on Thromb. Haemost., Paris Absract Volume, p. 8
Inhibition of collagen and thrombin-induced shape change of rabbit platelets.

95. NACHMANN, R.L., and MARKUS, A.J. (1968)
Br. J. Haematol. 15, 181
Immunological studies of proteins associated with the subcellular fraction of thrombasthenic and afibrinogenaemic platelets.

96. NATHAN, I., FLEISHER, G., LIVNE, A., DVILANSKI, A., and PAROLA, A.H. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 9822
Membrane microenvironmental changes during activation of human blood platelets by thrombin. A study with a fluorescent probe.

97. NATHAN, I., FLEISHER, G., DVILANSKI, A., LIVNE, A., and PAROLA, A.H. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 598, 417
Membrane dynamic alterations associated with activation of human platelets by thrombin.

98. O'BRIEN, J.R., and HEYWOOD, J.B. (1966)
J. Clin. Pathol. (Lond.) 19, 148
Effect of aggregating agents and their inhibitors on the mean platelet shape.

99. ODELL, T.T., and UPTON, A.C. (1955)
Acta Haematol. 14, 291
Distribution of calcium 45 in platelets and bone marrow of rats.

100. OKAMURA, I., and JAMIESON, G.A. (1976)
Thromb. Res. 8, 701
Platelet glycocalicin: A single receptor for platelet aggregation induced by thrombin or ristocetin.

101. OKAMURA, I., HASITZ, M., JAMIESON, G.A. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 3435
Platelet glycocalicin. Interaction with thrombin and role as thrombin receptor of the platelet surface.

102. PACKHAM, M.A., GUCCIONE, M.A., CHANG, P.-L., and MUSTARD, J.F. (1973)
Am. J. Physiol. 225, 38
Platelet aggregation and release: effects of low concentrations of thrombin or collagen.

103. PACKHAM, M.A., KINGLOUGH-RATHBONE, R.L., REIMERS, H.-J., SCOTT, S., and MUSTARD, J.F. (1977)
Spectrum Publications Inc., New York
In: Prostaglandins in Hematology.
M.J. Silver, J.B. Smith, C.C. Kocsis (eds.)
Mechanism of platelet aggregation independent of adenosine diphosphate.

104. PARETI, F.I., DAY, H.J., and MILLS, D.C.B. (1974)
Blood 44, 789
Nucleotide and serotonin metabolism in platelets with defective secondary aggregation.

105. PARETI, F.I., CAPITANIO, A., MANNUCCI, P.W. (1976)
Blood 48, 511
Acquired storage pool disease in platelets during disseminated intravascular coagulation.

106. PARMEGGIANI, A. (1961)
Thromb. Diath. Haemorrh. 6, 517
Elektronenoptische Beobachtungen an menschlichen Blutplättchen während der viskösen Metamorphose.

107. PASTERNAK, G.W., and SNYDER, S.H. (1974)
Molec. Pharmac. 10, 183
Opiate receptor binding: Effect of enzymatic treatments.

108. PHILLIPS, D.R., and AGIN, P.P. (1973)
Ser. Haematol. 6, 292
Thrombin-induced alterations in the surface structure of human platelet plasma membrane.

109. PHILLIPS, D.R. (1974)
Thromb. Diath. Haemorrh. 32, 207
Thrombin interaction with human platelet.

110. PHILLIPS, D.R., and AGIN, P.P. (1975)
In: Platelets. O.N. Ulutin (ed.)
Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam, p. 132
Thrombin interaction with human platelets. Evidence for both a binding and a proteolytic site on the plasma membrane.

111. PHILLIPS, D.R., and AGIN, P.P. (1977)
Biochim. Biophys. Res. Comm. 75, 940
Platelet plasma membrane glycoproteins. Identification of a proteolytic substrate for thrombin.

112. PHILLIPS, D.R. (1980)
In: Progress in Thrombosis and Haemostasis.
T.H. Spaet (ed.)
Grune and Stratton, New York 5, p. 81

113. PHILLIPS, D.R., JENNINGS, L.K., and EDWARDS, H.H. (1980)
J. Cell. Biol. 86, 77
Idenfitication of membrane proteins mediating the interaction of human platelets.

114. PHILLIPS, D.R. (1980)
Thromb. Haemostas. 42, 1638
Surface labelling as a tool to determine structure-function relationships of platelet plasma membrane glycoproteins.

115. PLETSCHER, A. (1968)
Br. J. Pharmacol. 32, 1
Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets.

116. PLETSCHER, A., DA PRADA, M., BERNEIS, K.H., and TRANZER, J.P. (1971)
Experientia 27, 993
New aspects on the storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets.

117. PLETSCHER, A., and DA PRADA, M. (1975)
In: Biochemistry and Pharmacology of Platelets.
K. Elliott, J. Knight (eds.)
Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam, Oxford, New York, p. 261
The organelles storing 5-hydroxytryptamine.

118. PODOLSAK, B. (1977)
Thromb. Haemostas. 37, 396
Effects of thrombin, chymotrypsin and aggregated gamma-globulins on the proteins of the human platelet-membrane.

119. RASMUSSEN, H. (1970)
Science 170, 404
Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate.

120. REIMERS, H.-J., PACKHAM, M.A., KINGLOUGH-RATHBONE, R.L., and MUSTARD, J.F. (1973)
Br. J. Haematol. 25, 675
Effect of repeated treatment of rabbit platelets with low concentrations of thrombin on their function, metabolism and survival.

121. REIMERS, H.-J., ALLEN, D.J., FEUERSTEIN, I.A., and MUSTARD, J.F. (1975)
J. Cell Biol. 65, 359
Transport and storage of serotonin by thrombin treated platelets.

122. REIMERS, H.-J., KINGLOUGH-RATHBONE, R.L., CAZENAVE, J.P., SENYI, A.F., HIRSH, J., PACKHAM, M.A., and MUSTARD, J.F. (1976)
Thrombos. Haemostas. 35, 151
In vitro and in vivo functions of thrombin treated platelets.

123. REIMERS, H.-J., PACKHAM, M.A., KINGLOUGH-RATHBONE, R.L., and MUSTARD, J.F. (1977)
J. Lab. Clin. Med. 90, 490
Adenine nucleotides in thrombin degranulated platelets: effect of prolonged circulation in vivo.

124. REIMERS, H.-J. (1979)
Habilitationsschrift: Der Thrombin-stimulierte Thrombozyt.
Düsseldorf 1979

125. ROBBLEE, L.S., SHEPRO, D., MELAMARICH, F.A., and TOWLE, C. (1973)
Ser. Haematol. 6, 311
Platelet calcium flux and the release reaction.

126. ROBBLEE, L.S., SHEPRO, D., and BELAMARICH, F.A. (1973)
J. Gen. Physiol. 61, 462
Calcium uptake and associated adenosine triphosphate activity of isolated platelet membranes.

127. ROBB-SMITH, A.H.T. (1967)
Br. J. Haematol. 13, 618
Why the platelet were discovered.

128. SATO, T., HERMAN, L., CHANDLER, J.A., STRACHER, A., and DETWILLER, T.C. (1975)
J. Histomech. Cytochem. 23, 103
Localization of a thrombin sensitive calcium pool in platelets.

129. SCHMID, H.J., JACKSON, D.P., and CONLEY, C.L. (1972)
Proceedings of the 3rd Congress on Thrombosis and Haemostasis, Washington, D.C.,
Mechanism of action of thrombin on platelets.

130. SKAER, R.J., PETERS, P.D., and EMMINES, J.P. (1974)
J. Cell Sci. 15, 679
The localization of calcium and phosphorus in human platelets.

131. SKAER, R.J. (1975)
In: Biochemestry and pharmacology of platelets.
K. Elliott, J. Knight (eds.)
Ciba Foundation Symposium 35 (new series)
Elsevier/Excerpta Medica/North Holland, Amsterdam, Oxford, New York, p. 239
Elemental composition of platelet dense bodies.

132. SKAER, R.J., PETERS, P.D. (1976)
J. Cell Sci. 20, 441
Platelet dense bodies: A quantitative microprobe analysis.

133. SNEDDON, J.M. (1972)
Nature New Biol. 236, 103
Divalent cations and the blood platelet release reaction.

134. SPICER, S.S., GREENE, W.B., and HARDIN, J.H. (1969)
J. Histochem. Cytochem. 17, 781
Ultrastructural localization of acid mucosubstance and antimonate-precipitable cation in human and rabbit platelet and megacarocytes.

135. STEINER, M., and TATEISHI, T. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 367, 232
Distribution and transport of calcium in human platelets.

136. THOMAS, D.P. (1967)
Nature 215, 198
Effect of catecholamines on platelet aggregation caused by thrombin.

137. TOLLEFSEN, D.M., FEAGLER, J.R., and MAJERUS, P.W. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 2646
The binding of thrombin to the surface of human platelets.

138. TRANZER, J.P., DA PRADA, M., PLETSCHER, A. (1966)
Nature (Lond.) 212, 1574
Ultrastructural localization of 5-HT in blood platelets.

139. TRANZER, J.P., DA PRADA, M., and PLETSCHER, A. (1968)
Adv. Pharmac. 6, 125
Electron microscopic study of the storage site of 5-hydroxy-tryptamine in blood platelets.

140. WALLACH, D.F.H., SURGENOR, D.M., and STEEL, B.B. (1958)
Blood 13, 589
Calcium-lipid complexes in human platelets.

141. WEBER, E., MALESSA, S., and LASCH, H.G. (1963)
Thrombos. Diath. Haemorrh. 9, 304
Veränderungen der freien Thrombozytennukleotide beim Sanarelli-Schwartzmann-Phänomen.

142. WEISS, H.J., TSCHOPP, T.B., BAUMGARTNER, H.R., SUSSMAN, J.T., JOHNSON, M.M., and EGAN, J.J. (1974)
Amer. J. Med. 293, 619
Decreased adhesion of giant (Bernard-Soulier) platelets to subendothelium. Further implications on the role of the von Willebrand's factor in hemostasis.

143. WHITE, J.G. (1971)
In: The circulating Platelet. S.A. Johnson (ed.)
Acad. Press, New York and London, p. 45
Platelet morphology.

144. WHITE, J.G. (1971)
In: Platelet aggregation. J. Caen (ed.)
Masson & Cie., Editeurs, Paris, p. 15
Platelet microtubules and microfilamentes: effects of cytochalasin B on structure and function.

145. WHITE, J.G. (1972)
Amer. J. Path. 66, 295
Interaction of membran systems in blood platelets.

146. WHITE, J.G. (1972)
Amer. J. Path. 69, 41
Exocytosis of secretory organelles from blood platelets incubated with cationic polypeptides.

147. WHITE, J.G., RAO, G.H., and GERRARD, J.M. (1974)
Amer. J. Path. 77, 135
Effect of the ionophore A23187 on blood platelets. I. Influence on aggregation and secretion.

148. WOLFE, S.M., and SHULMAN, N.R. (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 128
Inhibition of platelet energy production and release reaction by PGE_1, theophylline and cAMP.

149. ZUCKER, M.B., and BORRELLI, J. (1959)
J. Appl. Physiol. 14, 575
Viscous metamorphosis, clot retraction and other morphologic alterations in blood platelets.

150. ZAHAVI, J., and MARDER, V.J. (1974)
Am. J. Med. 56, 883
Aquired "storage pool disease" of platelets associated with circulating antiplatelet antibodies.

151. ZUZEL, M. (1971)
Society of Thrombosis and Haemostasis,Oslo, Norway, Abstract p. 278
ADP-induced aggregation of blood platelets released from clots by fibrinolysis in vitro.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Reimers für die Überlassung des Themas, die stete Unterstützung sowie für die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Morgenstern von der Universität Homburg/Saarland danken, der mir die Abfassung der morphologischen Aspekte der Arbeit ermöglichte.

Frau Weinberger danke ich für die zahlreichen Hilfen und Anregungen bei der Durchführung der Laborarbeiten.

L E B E N S L A U F

Am 12. Juni 1950 wurde ich als Sohn des Zahnarztes Dr. Günter Braumann und seiner Ehefrau Käthe geboren.
Ab 1957 Schulbesuch der Grundschule und des Gymnasiums, 1971 Abitur in Bremen.
1972 Studienbeginn an der Universität in Bonn, Fortsetzung des Studiums an den Universitäten Kiel und Düsseldorf.
1980 Staatsexamen der Medizin an der Universität Düsseldorf.
1977 Heirat, 1980 Geburt des ersten Kindes.
Seit 1980 Tätigkeit als Assistenzarzt an der Kinderklinik des Lukas-Krankenhauses in Neuss.